

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Higiene, Inspección y Microbiología de los Alimentos**



**TESIS DOCTORAL**

**Influencia del orujo de aceituna y de la grasa técnica de  
matadero en la composición lípida del molusco de Salmo  
Gairdnerii**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Lorenzo de la Hoz Perales**

**Madrid, 2015**

TP  
1983  
003

Lorenzo de la Hoz Perales



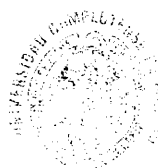
\* 5 3 0 9 8 6 7 6 5 1 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

1984

INFLUENCIA DEL ORUJO DE ACEITUNA Y DE LA GRASA TECNICA  
DE MATADERO EN LA COMPOSICION LIPIDICA DEL MUSCULO DE SALMO GAIRODNERII

Departamento de Higiene, Inspección y Microbiología de los Alimentos  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



1984

Colección Tesis Doctorales. Nº

3/85

© Lorenzo de la Hoz Perales  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 28015 Madrid  
Madrid, 1985  
Xerox 9400 X 721  
Depósito Legal: M-43719-1984

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID - FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE HIGIENE, INSPECCION  
Y MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

INFLUENCIA DEL CRUJO DE ACEITUNA Y DE LA GRASA  
TECNICA DE MATADERO EN LA COMPOSICION LIPIDICA  
DEL MUSCULO DE Salmo gairdnerii.

Tesis que presenta el Licenciado  
D. Lorenzo de la Hoz Perales  
para optar al grado de Doctor  
en Veterinaria.

Madrid, Mayo de 1.983



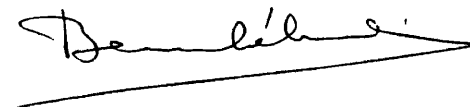
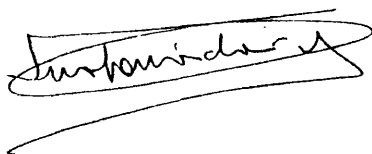
BERNABE SANZ PEREZ, CATEDRATICO DE "BROMATOLOGIA Y MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS" DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada "INFLUENCIA DEL ORUJO DE ACEITUNA Y DE LA GRASA TECNICA DE MATADERO EN LA COMPOSICION LIPIDICA DEL MUSCULO DE Salmo gairdnerii", de la que es autor D. Lorenzo de la Hoz Perales, ha sido realizada bajo la dirección conjunta del profesor adjunto Dr. D. Juan Antonio Ordóñez Pereda y del catedrático que suscribe en el Departamento de Higiene, Inspección y Microbiología de los Alimentos de esta Facultad y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 27 de Mayo de 1983.

El codirector





A mis padres.





## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceras gracias al Prof. Bernabé Sanz Pérez por acogerme en el Departamento que dirige. Igualmente deseo expresar mi gratitud a dicho profesor y al Dr. D. Juan Antonio Ordoñez Pereda por la dirección de esta tesis y por el interés con que me ayudaron y orientaron en todo momento.

También deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. D. Pascual López Lorenzo por su estímulo y desinteresada ayuda bibliográfica.

Mi reconocimiento se extiende también al Dr. D. Alvaro Zugaza Bilbao por su asesoramiento y ayuda en las experiencias referentes a la espectrofotometría infrarroja y a todas aquellas personas de los Departamentos de Higiene y Microbiología de los Alimentos y de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos que de alguna forma han contribuido a la realización de esta tesis.

La Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Madrid me concedió una beca de investigación en el campo de la Tecnología de los Alimentos para realizar el presente trabajo por lo que igualmente le estoy agradecido.

El Dr. Cuellar, profesor adjunto de la Facultad de Veterinaria de Madrid hizo las oportunas gestiones para que - I.C.O.N.A. por medio de D. José Peñalver pusiera a mi disposición las instalaciones, truchas y personal de la piscifactoría que este Organismo posee en Iruelas (Ávila). Sin esta ayuda hubiera sido difícil llevar a cabo las experiencias - que aquí se describen por lo que les expreso mi reconocimiento.



I

I N D I C E

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	1
I.1. Generalidades	1
I.2. Factores que influyen en el desarrollo de las truchas	4
1. Alimentación	4
1. Alimentación natural	4
2. Alimentación en cautividad	5
1. Necesidades proteicas	6
2. Relación proteína/energía	9
3. Acidos grasos esenciales	13
2. Otros factores	16
1. Temperatura	16
2. Calidad del agua	17
3. Influencias genéticas	18
I.3. Composición química del tejido muscular del pescado	19
1. Agua	21
2. Componentes nitrogenados	23
1. Componentes nitrogenados proteicos	24
2. Componentes nitrogenados no proteicos	26
I.4. Composición lipídica del pescado	29
1. Especie	31
1. Contenido en grasa	31

## II

	<u>Página</u>
2. Naturaleza de la grasa	34
3. Acidos grasos componentes de los lípidos	38
1. Acidos grasos saturados	40
2. Acidos grasos monoenoicos	41
3. Acidos grasos polienuicos	45
4. Influencia de la dieta en la composición en ácidos grasos	49
5. Influencia de la temperatura en la composición de ácidos grasos	58
I.5. La trucha como alimento	60
I.6. Justificación del trabajo	63
 II.MATERIAL, PRODUCTOS Y METODOS	 69
II.1. Material	69
1. Material biológico	69
2. Material empleado en la cría de las truchas	69
3. Material general de laboratorio	69
4. Concentración de volúmenes	71
II.2. Productos	71
1. Reactivos	71
2. Soportes cromatográficos y purificación de los mismos	72
3. Disolventes y purificación de los mismos	73
4. Disolventes para espectrofotometría infrarroja	74

	<u>Página</u>
5. Gases	74
II.3. Métodos	74
1. Preparación de los piensos	74
2. Condiciones ambientales del agua	75
3. Procedencia y selección de los animales	76
4. Obtención, transporte y preparación de las muestras	77
5. Medida y pesada de las truchas	78
6. Métodos químicos	78
1. Obtención de la muestra	78
2. Determinación del extracto seco	79
3. Determinación del contenido en grasa	79
4. Determinación de proteína	80
5. Determinación de la fibra bruta	81
6. Determinación de cenizas	82
7. Determinación de los Extractivos Libres de Nitrógeno (E.L.N.)	82
7. Metodología lipídica	82
1. Obtención de la muestra	82
2. Fraccionamiento de los lípidos en columna de ácido silícico/celita	83
a. Preparación de las columnas	83
b. Colocación de la muestra	83
c. Desarrollo de la cromatografía	83

#### IV

	<u>Página</u>
3. Fraccionamiento de los lípidos apolares	84
a. Fraccionamiento en columna de ácido silícico/celita	84
b. Fraccionamiento por cromatografía en capa fina	85
4. Fraccionamiento de los lípidos polares y de la fracción eluida con acetona	86
5. Identificación de los diferentes componentes lipídicos	86
6. Cromatografía en papel de los productos de hidrólisis de la fracción eluida con acetona	90
7. Aislamiento de los diferentes componentes lipídicos caracterizados por cromatografía en capa fina	91
8. Cuantificación de los diferentes componentes lipídicos caracterizados	93
1. Colesterol y ésteres del colesterol	93
2. Ácidos grasos libres	94
3. Hidrocarburos	96
4. Fosfolípidos	97
5. Glicéridos	99
9. Formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres	110

	<u>Página</u>
10. Transesterificación y formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los glicéridos y fosfolípidos	113
11. Cromatografía de los ésteres metílicos de los ácidos grasos	115
12. Identificación de los ácidos grasos	116
13. Cálculo de los porcentajes de los ácidos grasos identificados	116
14. Estimación del índice de iodo	116
8. Análisis sensorial	117
1. Jurado de catadores	117
2. Preparación de la muestra	117
3. Pruebas organolépticas	117
1. Prueba triangular	117
2. Pruebas de preferencia	118
III. RESULTADOS	121
III.1. Composición química de los piensos	122
2. Temperatura del agua de los estanques durante el periodo de experimentación	124
3. Variación en el peso y talla de las truchas sometidas a las distintas raciones experimentales	124



# VI

	<u>Página</u>
4. Evolución de la composición química de los diferentes lotes de truchas	124
5. Composición lipídica de los piensos	136
1. Extracción del material lipídico	136
2. Fraccionamiento del material lipídico en columnas de ácido silícico/celita	136
3. Composición en ácidos grasos de los extractos lipídicos	139
6. Composición lipídica de las truchas	149
1. Extracción del material lipídico	149
2. Fraccionamiento del material lipídico en columnas de ácido silícico/celita	149
3. Identificación de la fracción eluida con cloroformo (lípidos apolares)	165
1. Fraccionamiento de los lípidos apolares en columnas de ácido silícico/celita	165
2. Cromatografía en capa fina de las fracciones apolares eluidas de la columna de ácido silícico/celita	166
4. Cuantificación de las principales sustancias que componen la fracción de lípidos apolares	173
1. Colesterol libre y sus ésteres	173
2. Ácidos grasos libres	174
3. Hidrocarburos	178

## VII

	<u>Página</u>
4. Glicéridos	178
1. Triglicéridos	183
2. Diglicéridos	187
3. Monoglicéridos	187
5. Identificación de la fracción eluida con acetona	190
1. Comprobación de la presencia de glico- lípidos identificados provisionalmente como tales	195
6. Identificación de la fracción eluida con metanol	197
7. Cuantificación de los fosfolípidos	200
8. Composición en ácidos grasos de cada una de las fracciones aisladas	205
1. Ácidos grasos de los triglicéridos	205
2. Ácidos grasos de la fosfatidilcolina	210
3. Ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina	212
4. Estudio comparativo de los índices de iodo de los triglicéridos, fosfatidil- colina y fosfatidiletanolamina	218
5. Ácidos grasos de la cardiolipina	223
6. Ácidos grasos de la esfingomielina	226
7. Ácidos grasos de los diglicéridos	229
8. Ácidos grasos de la fracción ácidos grasos libres	232

# VIII

	<u>Página</u>
9. Acidos grasos de la lisofosfatidilcolina	235
10. Acidos grasos de los monoglicéridos	238
11. Acidos grasos de la fosfatidilserina	241
9. Analisis sensorial	244
1. Prueba triangular	244
2. Pruebas de preferencia	245
IV. DISCUSION	248
IV.1. Composición química de los piensos	248
2. Temperatura del agua	249
3. Peso y talla de las truchas	250
4. Composición química de las truchas	251
5. Composición en ácidos grasos de los piensos	253
6. Composición lipídica del músculo	255
1. Tasa y evolución de los lípidos apolares y polares	256
7. Lípidos apolares	262
8. Lípidos polares	267
9. Composición en ácidos grasos	271
1. Influencia de la dieta en la composición en ácidos grasos de los lípidos del músculo	278
1. Acido mirístico (C-14)	281
2. Acido palmitoleico (C-16:1)	282
3. Acido linoleico (C-18:2)	283

## IX

	<u>Página</u>
4. Acido eicosenoico (C-20:1)	284
5. Acidos octodecatetraenoico y araquidónico (C-18:4 y C-20:4)	284
6. Acido erúcico (C-22:1)	285
7. Acido docosahexaenoico (C-22:6)	285
10. Análisis sensorial	287
 V. CONCLUSIONES	 289
 BIBLIOGRAFIA	 293



## I. INTRODUCCION

### I.1 Generalidades

La trucha es un pez teleósteo perteneciente a la familia de los Salmónidos. Se caracteriza por la presencia de una segunda aleta dorsal transformada en tubérculo adiposo que carece, por tanto, de radios. Los representantes de esta familia se diferencian fácilmente de los restantes peces por ésta característica propia de los salmónidos y aunque algunos peces pueden también presentarla, como el Ictalurus punctatus, éste se diferencia de los salmónidos por la presencia de barbilla y por poseer piel desnuda.

Las truchas pertenecen al Suborden Salmonoidei que incluye especies de agua dulce, especies marinas y especies anadromas; las de agua dulce, una de las cuales constituye el objeto de este trabajo, son autóctonas de las zonas árticas y templadas del hemisferio Norte.

Las especies más características del género Salmo son:

- Salmo salar o salmón del Atlántico: pez anadromo que desova en agua dulce
- Salmo clarkii, llamado "bribona", que habita en los lagos glaciares de las montañas rocosas de E.E.U.U.
- Salmo stomachicus, caracterizado por tener las aletas negras.

- Salmo fario o trucha común de los ríos europeos
- Salmo gairdnerii (S. iridis) o trucha arco iris.

Antes se admitían diversas especies de trucha común - (S. fario, S. lacustris, S. marmoratus, etc.) y aunque todavía las admiten algunos (Lotina, 1974) recientes estudios han puesto de manifiesto que la especie es única y las evidentes variaciones observadas en coloración y forma se deben a diversos factores ecológicos (naturaleza de las aguas, alimentación, etc.). Sin embargo, Salmo gairdnerii ha conservado su entidad como especie; es autóctona de ciertos ríos de Norteamérica y fué descrita por primera vez por Richardson e introducida en Europa en el año 1882. Su apariencia es muy semejante a la de la común, pero puede ser reconocida por las bandas iridiscuentes de los flancos que, sobre todo en el periodo primaveral, reflejan la luz con irisaciones de color azul, violeta, rojo y rosa. De aquí su nombre vulgar: trucha arco iris. Por el cuerpo, con excepción de la zona ventral, presenta numerosas manchas negras de pequeñas dimensiones.

Esta trucha es de mayor tamaño que la común pudiendo alcanzar los animales adultos hasta 4-5 Kg de peso, aunque el peso del tipo comercial está situado en torno a los 200 g. Otra característica fisiológica que diferencia Salmo gairdnerii de Salmo fario es que la primera soporta con mayor facilidad fluctuaciones de temperatura, estando situada la óptima alrededor de los 14°C, pudiendo resistir sin perjuicio alguno

temperaturas comprendidas entre 0 y 23°C.

En vida libre, la trucha, es muy voraz y se nutre fundamentalmente de insectos, vermes, moluscos e incluso ataca a veces, cuando es adulta, a peces de talla menor que la suya.

La trucha vive perfectamente tanto en agua corriente como en aguas sin movimiento aunque su desarrollo depende de las peculiaridades físicas específicas de su entorno, tales como temperatura del agua, oxígeno disuelto, naturaleza del suelo, etc.

En condiciones naturales la trucha sólo necesita para desovar una corriente suficiente de agua; el desove, lo realiza en los remansos acuosos en los que excava los "nidos" - donde deposita incluso más de 1500 huevecillos. El desove de la trucha arco iris (Salmo gairdnerii) se realiza en Diciembre-Febrero, si bien la selección operada por los piscicultores ha producido un notable alargamiento de este periodo, - abarcando en la actualidad hasta 5 meses.

Aunque la alimentación sea el factor que más influye en el crecimiento de cualquier animal, en el caso de la trucha también deben tenerse muy presentes otros agentes relacionados con su hábitat. Una correcta dieta no es suficiente para lograr el desarrollo óptimo de las truchas; otros factores como temperatura, composición química, oxigenación y velocidad del agua, etc., deben ser convenientemente controlados si se pretende ob-



tener un rendimiento eficaz. Estos factores se analizarán en los próximos apartados.

## I.2 Factores que influyen en el desarrollo de las truchas

### I.2.1 Alimentación

#### I.2.1.1 Alimentación natural

Los hábitos alimenticios de las truchas en su medio natural han sido ampliamente estudiados. Se desconoce cuales son las razones que las impulsan a preferir en determinado tiempo y lugar ciertos alimentos de la amplia gama que, en cada estación, tienen a su disposición.

Puede decirse, en términos generales, que es un animal carnívoro. La mayoría de los animales que ingiere son acuáticos pero una pequeña porción puede proceder del medio terrestre.

Entre los animales que constituyen sus fuentes alimenticias habituales se encuentran:

- a.- vertebrados pequeños (peces, ranas, salamandras, renacuajos, etc.)
- b.- insectos y sus fases larvarias (moscas, abejas, libélulas, etc.)
- c.- crustáceos pequeños (cangrejo de río, etc.)
- d.- moluscos (caracoles, babosas, etc.)
- e.- gusanos acuáticos y terrestres (lombrices, etc.)

Los restos vegetales que a veces se encuentran en su estómago los ingiere de un modo accidental al capturar los animales que constituyen su alimento. La diversidad de esta dieta natural depende de las aguas, clima, flora y fauna ambiente.

#### I.2.1.2 Alimentación en cautividad

Cuando comenzó a desarrollarse el cultivo de la trucha se trató de imitar, en lo posible, la dieta natural pero a medida que avanzó la explotación se fueron perfeccionando las raciones para lograr un rendimiento máximo, con el fin de obtener la mayor rentabilidad de la explotación industrial.

Así, al principio, se intentó sustituir la dieta natural por alimentos próximos a los que la trucha capturaba en su hábitat natural. Para ello se suspendían en los estanques cadáveres de animales en los que proliferaban larvas de moscas que constituían el principal alimento de las truchas. Este procedimiento, además de los problemas higiénicos que presenta, era poco productivo por lo que rápidamente se sustituyó por dietas artificiales húmedas, secas o mixtas, preparadas con productos naturales. Una de las húmedas se componía de residuos de matadero y subproductos de la pesca; las de mayor valor nutritivo se reservaban para los alevines y truchas jóvenes y, las más pobres para los adultos. Más tarde se utilizaron dietas mixtas compuestas de una mezcla de los alimentos antes citados y de diversos productos pulverulentos, tanto de

origen animal como vegetal.

En la actualidad, el desarrollo de la tecnología de piensos y los estudios sobre las necesidades nutritivas de la trucha han dado lugar a que las dietas primitivas hayan sido sustituidas por otras secas que no son mas que harinas de diversa procedencia presentadas en forma de migas (para alevines) o gránulos (para animales en fase de crecimiento y/o engorde).

En la fabricación de los piensos se utilizan una gran diversidad de productos; entre ellos, harinas de pescado, de carne, de hígado, etc., o de ciertos vegetales como soja, cacahuete, algodón y otros. Las fórmulas de estos piensos están equilibradas con arreglo a las necesidades nutritivas de la trucha y normalmente se les adicionan sales minerales y vitaminas como principios activos y ciertos antioxidantes. La composición final de los gránulos es de un 9-10% de humedad y una riqueza en proteína del 40%. Las proteínas son el componente mayoritario de los piensos fabricados para la alimentación de las truchas. Una gran proporción del total del pienso lo constituyen también las cenizas y los extractivos libres de nitrógeno que alcanzan valores de más del 20%; ~~éstos~~ <sup>hay también</sup> están formados por mono, di y polisacáridos; <sup>T</sup>grasa (alrededor del 3%) y otros componentes minoritarios.

#### I.2.1.2.1 Necesidades proteicas

Las necesidades proteicas de los salmónidos son altas

en comparación con las de otros animales homeotermos (Mertz, 1969). En el caso del "salmón chinook" (Oncorhynchus tshawytscha) estas necesidades se han determinado con precisión; necesita una concentración del 40% de proteína a 8°C y del 55% a 15°C (DeLong y col., 1958). En la trucha arco iris (Salmo gairdnerii) tales necesidades no se han determinado con exactitud. Phillips y col. (1956) opinan que los alimentos naturales que contienen un 11,5% de proteínas, son más eficaces que los piensos que contienen un 28%, aunque otros autores (Holden y col., 1966) encuentran que una concentración del 18% es tan eficaz para el crecimiento de las truchas como la del 26%. En realidad estos porcentajes representan un 35% respecto a la materia seca. El NRC (National Research Council, 1973) estima que el nivel idóneo de proteína de la dieta es del 40%.

La función primordial de las proteínas es la plástica y tienen que aportar necesariamente los aminoácidos esenciales. El contenido proteico de las dietas artificiales es habitualmente de alrededor del 40%, como anteriormente se ha mencionado, lo que es más que suficiente para satisfacer las necesidades proteicas de las truchas. El exceso de proteína lo utiliza la trucha para cubrir sus necesidades energéticas. Phillips, (1969) indica que, en determinados momentos, el 70% de las calorías de la dieta provienen de las proteínas. Las truchas pueden convertir eficazmente la proteína ingerida en grasa corporal; esto en parte es posible gracias a la capacidad que tienen de excretar el nitrógeno sobrante en forma de amoníaco (Forster y Goldstein, 1969) lo que contrasta con los ma

míferos que necesariamente han de hacerlo en forma de urea.

Otro aspecto importante a tener en cuenta a la hora de preparar un pienso para la alimentación de truchas en cautividad es el tipo de proteína. Se ha comprobado que la calidad de este nutriente influye en el crecimiento y desarrollo de los animales. En este sentido es bastante esclarecedor el trabajo de Cho y col. (1974) en el que partiendo de una dieta control rica en proteína, procedente de harina de arenque complementada con los subproductos de ciertas fermentaciones (levadura de cerveza, extractos de la fermentación del almidón, suero en polvo), observaron que la harina de soja podía reemplazar perfectamente a la mitad de la harina de arenque, siempre que en la dieta persistiesen los productos de fermentación; si se eliminan éstos, los animales no alcanzan tasas de crecimiento iguales a los de la dieta control. De este trabajo puede concluirse, fundamentalmente, que a la hora de fabricar un pienso hay que tener siempre en cuenta su contenido proteico y su procedencia. En cualquier caso parece difícil establecer con exactitud las necesidades proteicas de las truchas ya que son muchos los factores que intervienen en la asimilación de las mismas, pudiendo variar ampliamente con las diferentes condiciones experimentales que se han utilizado para calcular dichas necesidades, tales como contenido en aminoácidos (Mertz, 1969), digestibilidad de la proteína y relación proteína/energía (Combs y col., 1962; Fowler y col., 1964; Ringrose, 1971; Lee y Putnam, 1973; Gulbrandsen y Utne, 1977), calidad y tem

peratura del agua (DeLong y col., 1958) y tamaño del pez (Satia, 1974). Por último, se ha demostrado recientemente que las diferencias genéticas influyen también poderosamente en las necesidades y nivel de conversión de las proteínas. En este último aspecto, el trabajo de Austreng y Refstie (1979) aporta datos interesantes. Las experiencias que realizaron les permitieron concluir que grupos de truchas arco iris (Salmo gairdnerii) de pequeño tamaño (61g), procedentes de 5 estirpes diferentes, sometidas durante 5 meses a dietas de contenido energético similar pero con distintos niveles proteicos (24 - 33 - 42 y 51%), presentaban diferencias significativas en lo concerniente a crecimiento, composición química y digestibilidad proteica. Asimismo la interacción entre dieta y estirpe fué muy significativa en relación con el peso y velocidad de crecimiento, y significativa con respecto al tamaño. Dichos autores concluyen que estas interacciones indican la necesidad de seleccionar las estirpes de truchas para elegir aquéllas que utilicen mejor la proteína.

#### 1.2.1.2.2 Relación proteína/energía

El alto porcentaje de proteína de los piensos origina, evidentemente, un encarecimiento de los mismos y, por tanto, ocasiona un menor beneficio de las explotaciones industriales de truchas. Por ello son muchos los estudios que se han realizado para sustituir parte de las proteínas por hidratos de carbono y/o grasa.

Las investigaciones sobre la relación entre necesidades proteicas/necesidades energéticas son difíciles de realizar debido a que la asimilación de los principios inmediatos está influenciada por diferencias genéticas y otros factores como los ambientales (temperatura, agua, etc.). Sin embargo, se han hecho numerosas experiencias con la intención de conocer cuál es la relación más adecuada entre proteína y energía.

En este sentido Phillips (1969) apunta que muchas veces hasta el 70% de la energía de la dieta procede de las proteínas y, por tanto, sería posible utilizar como fuente energética carbohidratos y/o grasa sin que se redujera el índice de crecimiento. No obstante, la extensión en que esta sustitución puede hacerse viene limitada por la fisiología de la trucha.

Entre las primeras experiencias realizadas al respecto se encuentran las de Phillips y col. (1948) quienes observaron que en truchas alimentadas con piensos ricos en glúcidos aparecen signos de degeneración hepática y cuando los niveles de almidón son bajos se observa un aumento del azúcar sanguíneo y del glucógeno hepático, lo que se debe a que el control hormonal del animal está sobresaturado con lo que puede originarse un coma diabético y por lo tanto la muerte (Phillips, 1969). Otros autores (Luquet, 1971) en truchas alimentadas con piensos que contenían del 10 al 54% de almidón de maíz no han podido detectar las lesiones hepáticas descritas por Phillips y col. (1948). A similares conclusiones habían llegado anterior-

mente DeLong y col. (1958), Bühler y Halver (1961) y Cowey y col. (1970).

Trabajos más recientes (Lee y Putnam, 1973) han estudiado de forma más exhaustiva la influencia de la relación proteína/energía de la dieta. Estos autores analizan el efecto de diferentes niveles de carbohidratos, proteínas y lípidos en la ganancia de peso, índice de conversión, utilización de las proteínas, tamaño del hígado y otras constantes corporales, llegando a la conclusión de que la cantidad de alimento ingerido por la trucha está regulado por el contenido energético de la dieta. Cuando las truchas consumen dietas bajas en energía no ganan peso a un ritmo comparable al conseguido cuando el contenido energético es alto. Creen que la correlación positiva que encuentran entre utilización de energía bruta y niveles proteicos de la dieta se debe a las diferencias en energía metabolizable que de acuerdo con Smith (1971), se podría atribuir inicialmente a la escasa utilización del almidón por la trucha pero Lee y Putnam (1973) han demostrado experimentalmente justamente lo contrario.

Las consideraciones expuestas anteriormente indican que en las experiencias efectuadas para conocer las necesidades proteicas y energéticas de los salmónidos se han obtenido resultados variables, confusos y, a veces, hasta contradictorios. Esta variación de resultados se cree que es consecuencia (Austreng y Refstie, 1969) de las distintas definiciones existentes



sobre necesidades proteicas. Los investigadores que se han preocupado de este problema han definido las necesidades proteicas de la trucha respecto del contenido proteico del pienso atendiendo a: 1.- máximo crecimiento; 2.- máximo beneficio económico; 3.- máxima acumulación proteica.

Respecto de los hidratos de carbono puede concluirse que la cantidad de los mismos que puede utilizarse para reemplazar a la proteína de la dieta es bastante limitada, dados los efectos negativos que pueden ocasionar en los animales y que todavía no están totalmente aclarados.

La sustitución parcial de las proteínas por grasa parece ofrecer mayores posibilidades, debido a que la trucha asimila los lípidos con mayor facilidad. En este sentido el aspecto más importante quizá sea la elección del tipo de grasa que ha de sustituir a la proteína debido a tres propiedades de la misma: 1.- grado de insaturación; 2.- longitud de la cadena; 3.- composición en ácidos grasos. El grado de insaturación está directamente relacionado con el estado físico de la grasa.

Se ha comprobado (Phillips, 1952 y 1963) que cuando se añaden a la dieta tasas superiores al 15% de aceites de pescado, como aceite de hígado de bacalao, se origina un considerable aumento del crecimiento; hecho que no ocurre con aceite de maíz. Se ha demostrado igualmente (Lee y Putnam, 1973) que dietas con alto contenido de aceite de arenque (24%) pueden reducir perfectamente en 1/3 el contenido proteico de la ración sin

que se manifieste disminución alguna del crecimiento. El aceite de arenque se caracteriza por su alto grado de insaturación. Sin embargo, otros aceites no proporcionan resultados satisfactorios. Un ejemplo destacado lo constituye el aceite de maíz que cuando es la única fuente lipídica determina que las truchas crezcan más lentamente que cuando al pienso se ha añadido aceite de origen marino (Lee y col., 1967). No obstante, la cantidad de aceite de pescado de la dieta puede ser importante en el desarrollo de las truchas. Algunos autores (Wojno y Tucholski, 1978) han observado que si la concentración de aceite de pescado es alta (10%) ejerce un efecto negativo en la digestibilidad de la proteína, en la utilización del pienso y, en definitiva, en el crecimiento de las truchas, aunque no afecta a la supervivencia de las mismas. A concentraciones del 6% no se observan tales efectos.

#### I.2.1.2.3 Ácidos grasos esenciales

Es bien conocida la diferencia en composición de los lípidos corporales de peces y mamíferos y se ha supuesto que ambos tipos de animales requieren ácidos grasos esenciales diferentes. Cabe destacar el mayor grado de insaturación de la grasa de los peces e igualmente la mayor longitud de cadena de los ácidos grasos entre los que predominan los de configuración  $\omega 3$ .

El aspecto más importante de la influencia de los lípi-

dos en los efectos adversos del desarrollo de la trucha estaba en los ácidos grasos esenciales. En 1929, Burr y Burr indicaron que para el crecimiento adecuado de las ratas se necesitaban ciertos lípidos lo que condujo al descubrimiento de que los ácidos grasos de estructura  $\omega 6$ , principalmente linoleico y araquidónico, eran esenciales para los mamíferos. Las primeras investigaciones que sobre este aspecto se realizaron en el pescado indicaron que existen diferencias respecto de los mamíferos. Nicolaides y Woodall (1962) demostraron que las dietas que contenían tanto ácido linolénico como linoleico originaban velocidades de crecimiento similares en el "salmón chinook" (Oncorhynchus tshawytscha) pero el ácido linoleico daba lugar a una pigmentación anormal de la piel. También se ha observado (Lee y col., 1967) que la alimentación con harina de maíz produce una alta mortalidad, observándose en los cadáveres lesiones anatómico - histológicas poco definidas. A partir de estos trabajos se empieza a investigar el efecto de los ácidos grasos  $\omega 3$  en el desarrollo de la trucha.

Una dieta (Lee y col., 1967) cuya fuente lipídica procedía del maíz con un 0,12% de ácido linolénico ( $\omega 3$ ) daba lugar a una mortalidad 5 veces mayor que la ocasionada por dietas con 0,25, 0,73, 0,75 y 1% de ácido linolénico. Asimismo, la ganancia de peso era significativamente menor en el caso de la primera dieta. La composición de ácidos grasos de los animales alimentados con cada dieta llevó a los autores a concluir que los  $\omega 3$  eran esenciales para el pescado pero quedó

la duda de si los  $\omega 6$  también lo eran, al igual que ocurre en los mamíferos. Sinnhuber (1969) cree que el  $\omega 6$  también es esencial. Con el fin de conocer el carácter esencial de las configuraciones  $\omega 6$  y  $\omega 3$  Castell y col. han realizado una serie de trabajos sobre el efecto de la presencia de ácidos grasos esenciales en el crecimiento, índice de conversión, deficiencias globales (Castell y col., 1972a) y síntomas causados por las dietas deficientes en ácidos grasos (Castell y col. 1972b).

En el primero de estos trabajos (Castell y col., 1972a), realizado con dietas semipurificadas carentes de ácidos grasos poliinsaturados, se observó, en las truchas, un escaso crecimiento y un índice de conversión bajo. La adición a estas dietas de ácido linoleico y linolénico estimuló el crecimiento y mejoró el índice de conversión siendo el linolénico el más eficaz a este respecto. Dichos autores establecieron las necesidades de linolénico de la dieta en un 1%. Los síntomas de la deficiencia se caracterizaron principalmente por erosiones de las aletas y miopatías cardíacas y desaparecieron al administrar a los peces ácido linolénico, mientras que con los de la serie  $\omega 6$  (linoleico) mejoró el crecimiento, pero no se aliviaron las enfermedades carenciales.

Aparte de los síntomas observados, la carencia en ácidos grasos de la serie  $\omega 3$  influye en otros aspectos fisiológicos de la trucha, tales como velocidad de hinchamiento de las mitocondrias, aumento del ritmo respiratorio hepático, disminución del contenido de hemoglobina de la sangre y aumento del

contenido de agua del músculo (Castell y col. 1972b).

Posteriormente Yu y Sinnhuber (1975) demostraron que el ácido linolénico (C-18:3w3) era un ácido graso esencial, cuya concentración en la dieta juega un papel importante. Con una concentración de ácido linolénico del 1%, tasa establecida por Castell y col. (1972a), es suficiente para lograr un crecimiento eficaz. Sin embargo, en los casos en que la cantidad de ácido linolénico de la ración es inferior a la mitad de la requerida, es decir, menor del 0,5%, la presencia del ácido linoleico (C-18:2w6) contrarresta esta deficiencia, siempre que sus valores no sean excesivos (en torno al 1,5%), ya que concentraciones de ácido linoleico del 5% ocasionan un retraso en el crecimiento y una mortalidad próxima al 40%.

#### 1.2.2 Otros factores

##### 1.2.2.1 Temperatura

Trabajando con Salmo trutta, Brown (1957), observó que crecía entre los 7-9°C y los 16-19°C. Opinaba que las temperaturas de crecimiento óptimo son aquellas a las que es máximo el apetito y las exigencias nutritivas son relativamente bajas, mientras que el crecimiento mínimo se da a temperaturas intermedias en las que las exigencias nutritivas son altas debido a las necesidades del pescado. Sin embargo, un análisis de las observaciones de Brown (1957) revela que sólo las temperaturas más bajas (7-9°C) se ajustan a esta hipótesis.

Sin embargo, otros investigadores no han podido confirmar las investigaciones de Brown (1957); por ejemplo, Swift (1961) usando un número mayor de animales encontró una sola temperatura óptima (12°C). Baldwin (1956) con ejemplares pequeños de Salvelinus fontinalis observó que 13°C era la temperatura óptima y que la utilización de alimentos consumidos por el pez con destino a su crecimiento, declinaba al aumentar la temperatura.

Para Salmo gairdnerii, la temperatura óptima de crecimiento depende de la cantidad de grasa de la dieta (Atherton y Aitken, 1970). Si el contenido de grasa es bajo, la temperatura óptima es similar a la de otras especies, es decir, 12°C, pero si el contenido de grasa es alto, la temperatura óptima es de 16°C. Estas diferencias hay que justificarlas por el equilibrio entre la eficacia de absorción intestinal y la demanda energética. A 16°C y con piensos ricos en grasa el crecimiento es mayor pues el pez absorbe eficazmente la grasa que como fuente de energía desplaza a los componentes nitrogenados; a 12°C la proteína tiene función plástica y energética por lo que el crecimiento máximo sólo se logra con dietas ricas en proteína y pobres en grasa.

#### 1.2.2.2. Calidad del agua

Las truchas son muy sensibles a las aguas ácidas que les provocan una disminución del apetito, retrasan su crecimiento y las predisponen a padecer parasitosis.

El pH más adecuado está en torno a 7. Las aguas ligeramente calcáreas son las mejores, mientras que, las ferruginosas y las ricas en sales de magnesio o en sulfato cálcico son menos apropiadas. Otro factor importante relacionado con el agua es el  $O_2$  disuelto. Se han dado valores óptimos de 9 mg de  $O_2$  por litro de agua lo que equivale a unos 6,4 ml/l de agua. Este valor, cuando la temperatura es de 20°C, corresponde al nivel de saturación. Por ello, quizá sea ésta una de las causas de la sensibilidad de las truchas a las temperaturas altas. A medida que la temperatura desciende, el nivel de saturación aumenta, de tal forma que, a 5°C, la saturación de  $O_2$  del agua corresponde a un valor de 12,8 mg/l.

Es importante también, el volumen de agua disponible. En su medio natural no constituye problema ya que siempre se supera el caudal establecido de 1 l/min. por cada 10 truchas. También se ha expresado como litro/Kg, es decir, que 1 litro de agua por minuto es suficiente para el desarrollo de un Kg de trucha a 15°C.

#### 1.2.2.3 Influencias genéticas

Las características genéticas influyen, evidentemente, en el desarrollo individual de las truchas. Esto ya fué demostrado independientemente por Davies (1934) y Dinsmore (1934) quienes observaron que la velocidad máxima de crecimiento del Salvelinus fontinalis dependía de condiciones intrínsecas del mismo individuo.

Austreng y Refstie (1979) han observado más recientemente grandes diferencias en el crecimiento de individuos pertenecientes a diferentes estirpes mantenidas con la misma dieta. Trabajando con distintas estirpes de Salmo gairdnerii, de unos 61 g, alimentadas durante 153 días con cuatro dietas distintas cuya concentración proteica oscilaba entre 24 y 51% observaron diferencias significativas entre las distintas estirpes. Al final del experimento la interacción entre dieta recibida y estirpe fué muy significativa respecto de la velocidad de crecimiento y significativa respecto de la talla. Los autores concluyeron que esta interacción obliga a seleccionar las truchas de una determinada estirpe atendiendo a su eficacia de utilización proteica.

### 1.3 Composición química del tejido muscular del pescado

La carne del pescado, que es la porción comestible más importante del mismo, está constituida por tejido muscular, tejido conectivo y grasa, principalmente. La composición química de la carne del pescado depende fundamentalmente de su contenido en:

- 1º Agua
- 2º Componentes nitrogenados
- 3º Lípidos
- 4º Hidratos de carbono
- 5º Minerales

La composición química es muy variable dependiendo de las especies, edad, estado fisiológico, actividad sexual, épo-



ca y región de captura.

El pescado de más edad es más rico en grasa y, por tanto, contiene una menor proporción de agua en su musculatura, y viceversa.

En determinadas épocas los peces son más delgados, más flácidos y menos vivaces que en otras, y la carne tiene un contenido mayor de agua, es más blanca y su riqueza en proteínas y grasa es menor. Se dice que el pescado de esta clase presenta un "estado pobre" o que está "fuera de temporada". Este estado se da después del desove, lo que ocurre en primavera en la mayoría de las especies que viven en aguas templadas o árticas. Antes del desove y durante él, la reserva de alimentos de la carne, y en algunas especies, del hígado, se utiliza para el desarrollo de las gónadas. Durante el desove y algún tiempo después, la mayoría de las especies consumen poco alimento salvo algunas excepciones como los elasmobranquios. Como consecuencia de estas circunstancias, la carne después del desove es pobre en proteínas, hidratos de carbono y grasa, y el pescado obtenido en estas condiciones está, por tanto, "agotado".

Una vez que los animales comienzan a alimentarse de nuevo, recuperan sus características habituales. Puede decirse, por tanto, que, de acuerdo con las estaciones, se observan cambios cíclicos en la composición de la carne de la mayoría, si no de todas las especies.

Estos cambios son más acusados en algunas especies pelágicas que tienen un alto contenido de grasa. Por ejemplo, el contenido intramuscular de grasa del arenque (Clupea harengus) puede variar de menos del 1% a más del 25% entre el periodo de inanición, después del desove, y la época de máxima alimentación (Connell, 1978). A pesar de este cambio, el peso total del animal se mantiene casi constante debido a la correspondiente reducción del contenido de agua.

#### 1.3.1 Agua

El agua de la carne del pescado está parcialmente ligada y parcialmente libre. El agua ligada está fuertemente retenida por las moléculas hidrófilas, principalmente proteínas; su hidratación depende de la estructura dipolar de las moléculas de agua, de la presencia de grupos funcionales activos - (amino, carboxilo, hidroxilo) en la molécula proteica y de la existencia de péptidos y otros componentes. Todos ellos favorecen la adsorción de agua.

El agua libre puede estar inmovilizada o puede ser estructuralmente libre; la primera se localiza en los microcapilares existentes entre las moléculas fibrilares, estructuras fibrosas y membranas celulares; permanece retenida en el tejido por la presión osmótica y adsorbida a las estructuras celulares que constituyen una red de membranas y fibras proteicas. El agua estructuralmente libre es la de los espacios intercelulares (donde está retenida por fuerzas capilares) y la del

plasma sanguíneo y linfa. El agua libre actúa como solvente de los componentes nitrogenados de bajo peso molecular y de las sales minerales presentes en la carne del pescado.

El agua es uno de los componentes que presenta mayores variaciones. De acuerdo con Zaitsev y col. (1969) el pescado se clasifica en graso, semigraso y magro, cuyo contenido de agua es el siguiente: pescado magro 80%, con pocas variaciones; pescado semigraso, 73,5 a 78,5%, con un promedio del 77%; los peces grasos son los que presentan las más amplias fluctuaciones, con valores comprendidos entre el 53 y 75% (Zaitsev, 1969). Cuando los animales están en estado de deplección este porcentaje aumenta.

Se acepta generalmente que en los peces existe una correlación inversa entre el contenido de grasa y de agua, mucho más acusada en el caso de las especies grasas; de tal forma que en algunas especies, los arenques por ejemplo, podría bastar con determinar el contenido de agua para deducir el de grasa (Bendes, 1954). La correlación negativa entre lípidos y agua es tanto a nivel de especie como de individuo e incluso de tipo y zona de músculo, siendo tanto más significativa cuanto mayor sea el contenido de grasa (Frontier-Abou, 1969). Esto no sólo ocurre en los animales de origen marino sino también en los de aguas continentales, como la trucha, cuya correlación negativa es significativa a nivel de 0,01 (Fernández, 1977).

Suele aceptarse que en los sistemas vivos existe una estrecha dependencia entre el contenido de agua y <sup>de</sup> proteína.

Por ejemplo, en los carángidos (Frontier-Abou, 1969) se ha demostrado que en los músculos grasos rojos existe una correlación positiva entre agua y proteína, mientras que en los músculos magros la correlación es negativa. En el caso particular de la trucha (Salmo fario) se ha observado (Fernández, 1977) una correlación negativa muy estrecha entre agua y proteína, significativa a nivel de 0,001.

#### 1.3.2 Componentes nitrogenados

La mayor parte de los componentes nitrogenados están formando las proteínas. No obstante, el tejido muscular contiene también compuestos nitrogenados no proteicos.

El músculo del pescado, dependiendo del tipo de esqueleto (óseo o cartilaginoso), tiene cantidades diferentes de proteína y de sustancias nitrogenadas no proteicas; también es distinta la relación entre ellas. Los músculos de los peces teleósteos contienen entre el 2,4 y 3,3% de nitrógeno, del que la mayor parte, entre el 80-90%, es nitrógeno proteico y el resto está formando parte de las sustancias nitrogenadas no proteicas. En los peces cartilaginosos el nitrógeno total alcanza un valor mayor, del 3,5 al 4%, y a veces más.; el 55-65% es nitrógeno proteico y el resto forma parte de las sustancias nitrogenadas no proteicas.

A pesar de estas diferencias en cantidad de componentes nitrogenados, el contenido de nitrógeno proteico respecto del peso del músculo fresco es aproximadamente el mismo tanto en

los peces teleósteos como en los cartilagosos.

#### I.3.2.1 Componentes nitrogenados proteicos

Conocer la composición y propiedades de los diferentes componentes nitrogenados tiene un gran interés práctico dado que las características propias del músculo dependen en gran parte de la concentración y proporción de tales componentes.

Atendiendo a su solubilidad las proteínas podemos dividir las en:

a) Proteínas sarcoplasmáticas o fácilmente solubles: comprenden la mayoría de los enzimas del músculo; su importancia radica en los cambios bioquímicos que ocurren tras la captura. Aparte de los enzimas, en esta fracción se incluyen también una serie de proteínas, cuyo número varía con el método de separación utilizado, aunque suele estar comprendido entre 7 y 11 fracciones (Connell, 1953a; Seagran, 1958; Dingle y Dyer, 1955).

El porcentaje varía dependiendo de la especie y del método de extracción (Scopes, 1964). La cantidad de nitrógeno de estas proteínas supone el 20-25% del nitrógeno total (Dyer y Dingle, 1961; Connell, 1962; Zaitsev y col., 1969).

Según Zaitsev y col. (1969) las proteínas sarcoplasmáticas comprenden:

- Albúminas: 6-8%
- Mioalbúminas: 7%
- Globulina X: 8-10%

- Mioproteínas: 1% (específica del músculo del pescado)

- Miostrominas: no solubles en agua, pero sí en soluciones ácidas o alcalinas débiles.

b) Proteínas estructurales: son las más abundantes, constituyen del 67 al 75% del total de proteínas musculares (Dyer y col., 1950). Entre ellas destacan:

- Miosina: es la más importante cuantitativamente y representa el 50% del total de las proteínas contráctiles (Bendall, 1974).

- Actina: supone el 27% de las proteínas estructurales del músculo (Bendall, 1974).

- Actomiosina: fué la primera proteína miofibrilar que se aisló. Está formada por un complejo constituido por la unión de moléculas de actina y miosina.

- Tropomiosina: constituye un 12% del total de - proteína miofibrilar.

- Troponina: es una proteína globular con alto contenido en prolina y se encuentra asociada a los filamentos de actina.

-  $\alpha$ - Actinina: es una proteína similar a la actina (Ebashi y Kodama, 1966). Algunos autores sugieren que actúa uniéndose a la actina F (Briskey y col., 1967; Bendall, 1974).

- Miofibrilina: es la proteína miofibrilar más recientemente aislada (Guba y Harsanyi, 1966). Se cree que es idéntica a la denominada proteína S cuya función sería unir en el sarcómero dos filamentos de actina.

Las proteínas estructurales han sido las más estudiadas, dado el papel que representan en la instauración y resolución del rigor mortis; entre las principales publicaciones realizadas al respecto merecen citarse las de Huxley (1963), Ebashi (1965), Ebashi y Kodama (1966), Cohen y Longley (1966), Guba y Harsanyi (1966), Briskey y col. (1967), Bodwell (1967), - Bendall (1974), Lehninger (1974).

c) Proteínas insolubles o del estroma: son las presentes en el tejido conectivo y paredes celulares. En el pescado tienen poca importancia ya que su cantidad es pequeña.

El tejido conectivo del pescado es mucho más débil y más fácil de romper que el de los mamíferos. El colágeno se degrada más rápidamente que el procedente del músculo de los mamíferos y a temperaturas más bajas. La naturaleza de estas proteínas no se conoce suficientemente, pero se sabe que poseen colágeno y elastina si bien se desconocen los porcentajes exactos que representan del total de proteínas. Parece ser que su riqueza varía en función del tamaño, madurez sexual y estación del año (Connell, 1962). En cualquier caso el porcentaje de estas proteínas en los peces es mucho más bajo que el 17% hallado en los mamíferos.

#### I.3.2.2 Componentes nitrogenados no proteicos

Estas sustancias están disueltas en el plasma celular

y en el líquido intercelular, se denominan también sustancias extractivas nitrogenadas. En la mayoría de los peces constituyen sólo una pequeña porción del total del nitrógeno muscular.

Un 95% o más del nitrógeno no proteico está formado por aminoácidos, dipéptidos, compuestos de guanidina, óxido de tri metilamina, urea, nucleótidos y compuestos afines a los mismos.

Shewan y col. (1952) opinan que la composición de esta fracción es específica: cada especie se caracteriza por un - constituyente particular o por la ausencia de un determinado compuesto. Las similitudes en los compuestos permiten reagru par las especies en familias y órdenes de acuerdo con la clasificación habitual.

La carne del músculo oscuro contiene niveles extremada mente altos de histidina que se han asociado a intoxicación por histamina (intoxicación escombroides) producida cuando el pescado se altera (Arnold y Brown, 1978). El músculo de la an guila contiene un alto contenido en carnosina (Suyama y col., 1970) mientras que en otras especies esta amina se encuentra a niveles muy bajos (Suyama y Yoshizawa, 1973). El músculo del tiburón contiene cantidades significativamente abundantes de anserina (Suyama y Suzuki, 1975). También los gádidos son ricos en este dipéptido que es escindido enzimáticamente, al en vejecer el pescado, a los aminoácidos que lo constituyen (Sanz Pérez y Jones, 1962), mientras que la balenina alcanza niveles



significativos en el músculo de la ballena (Suyama y col., 1970)

Otro componente relativamente abundante de las especies marinas es el óxido de trimetilamina (OTMA) que alcanza los valores máximos en los tejidos de los elasmobranquios, seguido de los gádidos (Harada, 1975). El OTMA presente en el pescado se reduce, por acción bacteriana y/o enzimática, a TMA que origina un color característico a pescado alterado. Por ello, las tasas de TMA se han utilizado como índice de alteración del pescado.

El amoníaco es un constituyente normal de los músculos del pescado que procede de las desaminaciones de ciertos procesos metabólicos, como el ~~pase~~ de adenina a hipoxantina (Soudan, 1965)

La urea tiene una gran importancia, sobre todo en los elasmobranquios (Read, 1968), ya que se acumula en el organismo y procede principalmente del ciclo ornitina-urea (Watts, 1974)

Las sustancias nitrogenadas no proteicas tienen interés práctico en el control de los procesos tecnológicos y en la descomposición del pescado, ya que durante su conservación se producen modificaciones, tanto cuantitativas como cualitativas, que acarrearán la aparición de olores y sabores anómalos cuya medida proporciona unos buenos índices de calidad, permitiendo así determinar el grado de frescura del pescado.

#### 1.4 Composición lipídica del pescado

El contenido proteico de las carnes que se encuentran en el mercado procedentes de los animales de abasto está muy normalizado y goza de gran estima comercial; en cambio a la grasa apenas se le concede importancia, no se menciona o sólo se hace en raras ocasiones. Si acaso, se tiene en cuenta simplemente para señalar los niveles energéticos y de colesterol de la carne; nunca se presta atención al tipo de lípidos que forman parte de su composición, ni a los ácidos grasos que posee.

En el caso del pescado es necesario conocer en profundidad la composición grasa del tejido muscular. Nunca debe despreciarse la grasa de la parte comestible del pescado debido a que en ella van incluidos algunos de los componentes naturales que participan en el sabor. Igualmente algunos lípidos y los ácidos grasos que los componen participan en la textura de la carne del pescado; en el pescado graso, la grasa influye mucho más en la textura que en el magro. Por estas razones, la grasa, es un componente que merece ser estudiado, lo que se ha realizado con cierta profundidad.

Salvo en el pescado graso (más del 5% de grasa en el tejido muscular, Exler y col., 1975) el hígado y las vísceras

son los órganos donde se localiza la mayor parte de la grasa. No obstante, también se encuentra distribuida por otras estructuras orgánicas tales como tejido muscular, piel, huevas, etc.

Son varios los factores que influyen tanto en la cantidad como en la naturaleza de los lípidos que componen la fracción grasa de los animales acuáticos. De acuerdo con Lovern (1950) estos factores pueden resumirse en:

a) Especie: es bien conocida la influencia de los factores genéticos en las diferencias de composición cualitativa y cuantitativa de la grasa.

b) Dieta: aunque su influencia no sea tan obvia como la de los caracteres genéticos es también importante. La tendencia general entre científicos es aceptar que el tipo de grasa que se deposita en el organismo tiene una composición similar a la que se suministra con el alimento. Este factor solo resulta esencial cuando la dieta contiene proporciones apreciables de grasa.

c) Temperatura: a medida que la temperatura del hábitat baja es mayor el grado de insaturación de los ácidos grasos.

d) Salinidad: la composición de la grasa del pescado de agua dulce es diferente de la de los de origen marino. La salinidad parece ser un factor crítico a este respecto.

e) Movilización selectiva: al metabolizarse la grasa

los lípidos de moléculas más pequeñas se utilizan más fácilmente, lo que influye en la composición grasa del animal. No obstante este factor no parece ser muy decisivo.

f) Distribución selectiva: la grasa se distribuye por todas las partes del cuerpo con arreglo a un cierto orden.

Aunque no recogidos por Lovern (1950) habría que añadir otros factores que también influyen poderosamente en la calidad y cantidad de la grasa del pescado. Dichos factores son:

1º Factores intrínsecos: principalmente localización anatómica y sexo

2º Factores ambientales: época del año, profundidad en la que vive el animal, presión, etc.

A continuación se analizarán los factores que se consideran de mayor importancia.

#### I.4.1 Especie

##### I.4.1.1 Contenido en grasa

El contenido en grasa del pescado sufre variaciones interespecíficas significativas. Por ello, se han hecho muchos esfuerzos para distinguir diferentes categorías de pescado en relación con su contenido en grasa. Así Jacquot (1961) y Zaitsev y col. (1969) los clasifican en grasos, semigrasos y magros

de acuerdo con su contenido en grasa. Stansby y Olcott (1967) los clasifican en 5 categorías de acuerdo con el contenido com junto de grasa y proteína: a) poca grasa-mucha proteína; b) gra sa media-mucha proteína; c) mucha grasa-poca proteína; d) poca grasa- muchísima proteína y e) poca grasa-poca proteína; Exler y col. (1975) utilizan la clasificación de peces grasos y ma- gros estableciendo el límite entre una y otra categoría en el 5% de grasa.

Para ilustrar las amplias variaciones de contenido gra- so de especies diferentes, se ofrece a continuación el porcen- taje de grasa de varios pescados; así el bacalao (Gadus morhua) contiene un 0,59% (Addison y col., 1968), la merluza<sup>del Cabo</sup> (Merlucius capensis) 1,55% (Koning, 1966a); la sardina "pilchard" (Sardina ocellata) (Koning y McMullan, 1966) y la caballa (Scomber scom- brus) pueden alcanzar hasta el 24% (Hardy y Keay, 1972). Para la trucha (Salmo iridis) se han dado valores medios de un 5% (Gray y McFarlane, 1961).

Atendiendo al nivel de grasa establecido en un 5% (Ex- ler y col., 1975) para separar el pescado graso del magro, la trucha ocupa un término medio dados los diferentes porcentajes de grasa descritos en la literatura. Por ejemplo, Kinsella y col. (1977) dan valores del 3,1<sup>+</sup> 1,3 para Salmo gairdnerii; Fernández (1977a) en Salmo fario de vida silvestre encuentra

tasas comprendidas entre el 1 y 5% y Luquet (1971) obtiene valores algo superiores a los de los anteriores autores, en torno al 14%. Se observan pues amplias variaciones en el contenido de grasa de las truchas, incluso, a veces, para una misma especie como la trucha de lago (Cristivomer namaycush siscovet) y por un mismo autor (Thurston y col., 1959) se dan valores comprendidos entre el 1,9 y 63%.

Podría concluirse diciendo que la trucha es un animal acuático de composición grasa muy variable, no pudiendo englobársele de forma categórica, ni entre los peces grasos, ni entre los magros.

La grasa no se distribuye de una forma uniforme por todo el cuerpo del animal. La composición varía ampliamente dependiendo del tejido u órgano considerado.

Los peces magros, como el bacalao (Gadus morhua) tienen hígados grasos (Jangaard y col., 1967). La carne de la región ventral es más rica en grasa que la dorsal (Jacquot, 1961; Ackman y Eaton, 1971a). La piel de algunas especies como los escombridos, por ejemplo la caballa (Scomber scombrus), posee un alto contenido de grasa (Ke y Ackman, 1976) que representa el 50% de los componentes de la piel y el 40% del total de la grasa corporal. Igualmente existen diferencias significativas entre otras regiones corporales como cabeza, espina, intestino,

músculo rojo, músculo blanco, etc.

Las variaciones corporales no sólo afectan al pescado de origen marino sino que también se han observado en el procedente de agua dulce, aunque han recibido menor atención por parte de los investigadores; excepto para la anguila (Anquilla anquilla) (Summer y Hopkirk, 1976; Polesello y col., 1977), carpa (Cyprinus carpio) (Steffens, 1974) y trucha de río (Salmo fario) (Fernández, 1977).

En el caso de la trucha de río (Salmo fario), Fernández (1977) ha dado valores comprendidos entre 1 y 5% para el contenido en grasa del músculo, dependiendo del sexo y época del año. En las gónadas las variaciones señaladas por el mismo autor van del 2,9 al 10,7% aunque en este caso las diferencias entre sexos son más dispersas y en el hígado dichas variaciones están comprendidas entre el 3,2 y 7,8%.

Aparte de las variaciones en composición de las diferentes especies, existen diferencias intraespecíficas que dependen de otros factores (variaciones estacionales, sexo, alimentación, edad, etc.) que se describirán más adelante.

#### 1.4.1.2 Naturaleza de la grasa

El término grasa engloba un grupo muy heterogéneo de

sustancias que pueden dividirse, desde un punto de vista funcional, en dos grandes grupos:

1º lípidos de reserva: son los que se encuentran en proporciones superiores al 1% del peso vivo (Lovern, 1962) y en los peces que poseen músculos rojos y blancos abundan más en los primeros. Están constituidos, al igual que en los vertebrados terrestres y en los vegetales, casi exclusivamente por triglicéridos. No obstante, en algunas especies de peces de origen marina, como los elasmobranquios, los triglicéridos son en parte reemplazados por otros lípidos de depósito tales como diglicéridos (Lovern, 1962). En la grasa muscular de la trucha común (Salmo fario) se han dado valores muy variables (Fernández, 1977), dependiendo de la época del año, de mono- y diglicéridos. Las variaciones oscilan entre un 3% en el mes de Julio y más del 45% en el de Diciembre.

En algunos peces no utilizados como alimento humano, géneros Ruvettus, Xenogramma, Hoplostethus, etc., los triglicéridos son sustituidos totalmente por ceras (Matsumoto y col., 1955; Kauffmann y Gottscholk, 1956).

2º lípidos estructurales: son aquellos que no sirven como material de reserva sino que desempeñan alguna otra función biológica. La mayor parte está constituida por fosfolípidos representados por fosfatidilcolina, fosfatidiletanola-



mina, cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina. En peces de agua dulce, como la trucha común (Salmo fario) se ha descrito (Fernández, 1977) una variedad de fosfolípidos menor (lisofosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina).

Aunque en animales de diferentes especies siempre se caracterizan, en términos generales, las mismas fracciones lipídicas, las concentraciones de cada una de ellas varían con la especie. Así se ha descrito que la grasa del músculo del bacalao (Addison y col., 1968) sólo contiene un 0,7% de lípidos neutros de los cuales el 35% son triglicéridos y el 50% esteroides. En otras especies como la sardina "pilchard" (Sardina ocellata), la merluza del Cabo (Merluccius capensis) y la trucha arco iris (Salmo iridis) se han dado valores de lípidos neutros de 3,9% (Koning y McMullan, 1966), 1% (Koning, 1966a) y 4,68% (Gray y MacFarlane, 1961), correspondiendo casi el 100% a triglicéridos.

Los valores hallados de lípidos polares en los mismos animales son del 0,52% para el bacalao (Addison y col., 1968), del 0,46% para la merluza (Koning, 1966a), del 0,91% para la sardina "pilchard" (Koning y McMullan, 1966) y del 0,63% para

la trucha (Gray y MacFarlane, 1961) siendo siempre la fosfatidilcolina la fracción predominante seguida de la fosfatidiletanolamina.

Los resultados que obtiene Fernández (1977) para la trucha de río (Salmo fario) son más difíciles de expresar de forma concisa ya que su estudio lo realiza teniendo en cuenta el sexo y la época del año. Para los machos encuentra un máximo de lípidos neutros del 2,8% y un mínimo del 0,6% y en hembras dichos porcentajes están comprendidos entre el 0,3 y el 2,4%. En el caso de los fosfolípidos el valor máximo para los machos es del 1,3% y el mínimo de 0,6% y en las hembras 2,1 y 0,6%, respectivamente.

La época del año también influye igualmente en la concentración de lípidos neutros y polares de los peces de origen marino. Por ejemplo en la caballa (Scomber scombrus), el valor máximo de lípidos neutros descrito en la bibliografía es del 22% (Hardy y Keay, 1972) y el mínimo de 1,2% (Viviani y col., 1967). En el caso de los fosfolípidos el valor máximo es del 1,6% (Ackman y Eaton, 1971) en el músculo rojo y el mínimo de 0,5% en el músculo blanco (Ackman y Eaton, 1971). Otros autores han dado valores similares para ambos músculos (Hardy y Keay, 1972; Ueda, 1976; Viviani y col., 1967).

#### .I.4.1.3 Ácidos grasos componentes de los lípidos

La grasa del pescado se diferencia de las grasas vegetales y de la procedente de los animales terrestres en dos aspectos fundamentales:

1º en el pescado la proporción de ácidos grasos de cadena larga es mayor

2º las grasas del pescado son más ricas en ácidos grasos poliinsaturados

Los ácidos grasos saturados suelen tener de 12 a 24 - átomos de carbono aunque, a veces, también se detectan ácidos grasos de cadena más corta.

La longitud de la cadena de los insaturados oscila entre 14 y 22 átomos de carbono aunque también se han detectado otros de cadena más corta (C-10:1; C-12:1) y más larga (C-24:1).

Los dobles enlaces son siempre de configuración cis-; sólo una vez (Hooper y col., 1973) se ha descrito un doble enlace en posición trans- (C-16:1w6), en el Mola mola o pez luna. Los ácidos grasos poliinsaturados no poseen dobles enlaces conjugados, sino que pertenecen invariablemente al tipo denominado de "cadena de dobles enlaces interrumpidos por grupos metílicos".

La gran mayoría de los ácidos grasos, como ocurre en todos los sistemas biológicos, tienen un número par de átomos de carbono, aunque también se encuentran en pequeños porcentajes los de cadena impar, comprendidos entre el C-15:0 y C-21:0. De los ácidos grasos impares insaturados de cadena larga sólo se ha detectado el C-21:5w3 (Ackman, 1979). De los ramificados se han detectado los isómeros iso y anteiso (Kaitaranta y Linko, 1979)

La complejidad de los ácidos grasos de los lípidos del músculo del pescado es mucho mayor que la de los mamíferos debido a la existencia de múltiples isómeros de los ácidos mono- y polienoicos. Así, en los aceites de pescado se han descrito 12 ácidos grasos de 20 átomos de carbono, 10 de 18 átomos de carbono y 9 de 22 átomos de carbono (Ackman, 1979).

La mayor parte de los ácidos grasos poliinsaturados pertenecen a las series w3, w6 y w9 de los ácidos grasos de 18 o más átomos de carbono; no obstante, también pueden encontrarse w1, w4, w5 y w7 (Kaitaranta y Linko, 1979; Ackman, 1979)

Del mismo modo que existen diferencias interespecíficas en el contenido total de grasa y en la naturaleza de los lípidos que la componen, también las hay tanto en los lípidos apolares como en los polares.

#### I.4.1.3.1 Acidos grasos saturados

En la grasa del pescado, al igual que en la mayoría de los animales, el palmítico (C-16:0) es el ácido graso saturado más abundante (10-30%). Cuando alcanza valores más bajos (próximos al 10%) aumenta la concentración de mirístico, tal como han observado Ackman y col. (1969) en el capelán de Terra nova (Mallopus villosus) cuyo ácido C-16 alcanza un 9% lo mismo que el C-14:0. En otras especies la tasa de C-14 oscila entre el 3-6%. No obstante, a veces se ha señalado que algunos lípidos polares presentan una tasa de C-16:0 que llega a concentraciones mayores del 30%; en este sentido Fernández y Burgos (1977) han visto que el C-16 puede llegar a más del 40% en la esfingomielina y fosfatidiletanolamina del músculo de trucha de río (Salmo fario) e incluso alcanzar el 63% en la lisofosfatidilcolina.

Cuando la concentración total de ácidos grasos saturados está comprendida entre el 20-30%, el esteárico (C-18:0) no alcanza concentraciones superiores al 1-3% y el C-20, C-22 y C-24 sólo se hallan a niveles menores del 0,1% (Ackman, 1979). Todos estos ácidos grasos puede sintetizarlos el organismo pero también pueden absorberse a partir de las grasas componentes de la dieta (Addison y Ackman, 1970; Paradis y Ackman, 1976 y 1976a).

Otro tipo de ácidos grasos que se encuentran con frecuencia en la grasa del pescado son los ramificados, fundamentalmente los C-15, C-17 y C-18, tanto en su forma iso como anteiso, pudiendo llegar a concentraciones próximas al 1% (Kaitaranta y Linko, 1979); se cree que se originan por síntesis endógena de las bacterias que habitan en el intestino de los peces (Hamidy y col., 1978). Dichas bacterias pueden dar lugar también a otros ácidos grasos raros de cadena lineal (Kunimoto y col., 1975).

#### 1.4.1.3.2 Ácidos grasos monoenoicos

Los ácidos grasos monoenoicos de la grasa del pescado puede sintetizarlos el animal a partir del acetato, siguiendo la misma ruta utilizada por otros organismos.

Se cree que en determinadas especies el mismo animal puede controlar la suma del porcentaje total de C-16:1 y C-18:1 dado que se ha observado que animales procedentes de ambos lados del Atlántico, por ejemplo el capelán de Terranova (Mallotus villosus), presentan un mismo valor en la suma de estos dos ácidos grasos (Eaton y col., 1975). Entre los isómeros de los ácidos grasos monoenoicos hay grandes variaciones. Así, en el caso del C-20:1, se detectan siempre el C-20:1w9, el C-20:1w11 y C-20:1w7. No obstante, también pueden encontrarse

otros isómeros como el C-20:1w5 pero en cantidades menores del 0,1% e incluso indetectables (Ackman, 1979).

Como ocurre con el C-22:1 cuyo isómero dominante en los pescados marinos es el C-22:1w11 (Ackman, 1979), en la grasa procedente de algunos animales de agua dulce (Ackman y col., 1969) parece ser que el dominante es el C-22:1w9. La abundancia de las series C-22:1 parece que guarda estrecha relación con la alimentación que el animal recibe. Así, por ejemplo, se ha demostrado que los copépodos del Atlántico Norte contienen ácidos alcóholes con un contenido muy alto de C-22:1 principalmente w11 (Ackman y col., 1974; Pascal y Ackman, 1976). De la serie C-22:1 corrientemente existen tres isómeros, w9, w11 y w7; el C-22:1w11 es el que se encuentra en mayores proporciones pudiendo incluso llegar hasta el 21% en el arenque del Atlántico y rara vez se encuentra en concentraciones inferiores al 4% (Ackman, 1979). Este ácido graso, al igual que los anteriores, procede de la dieta. Esto no sólo ocurre en los peces sino también en los mamíferos marinos; por ejemplo la ballena del Atlántico Norte tiene un alto contenido de C-22:1 siendo su alimentación principal crustáceos del zooplacton con un alto contenido (8%) de C-22:1 (Ackman y col., 1970) mientras que la ballena del Atlántico Sur ofrece un contenido de C-22:1 mucho menor debido a que su alimentación principal es

el krill (Eufasia superba) cuya riqueza en C-22:1 es del 0,4% (Mori y Hikichi, 1976).

En general, como la presencia de ácidos grasos monoenoicos de más de 18 átomos de carbono depende principalmente de la alimentación, puede decirse que su proporción en lípidos apolares varía con la especie pero debido no a caracteres genéticos sino al hábitat. No ocurre lo mismo en el caso de los lípidos polares ya que éstos no son de reserva sino funcionales. El caso más destacado quizá sea el del arenque del Atlántico (Clupea harengus). Los ácidos grasos C-18:1, C-20:1 y C-22:1 de la fracción triglicérido de este animal alcanzan valores del 15,5, 13,7, y 19,4% respectivamente mientras que en la fracción lípidos polares los mismos ácidos grasos alcanzan valores de 13,0, 2,4 y 1,6% (Addison y col., 1969). Por otra parte, en el aceite obtenido a partir del arenque del Pacífico (Clupea harengus pallasi) el C-20:1 y el C-22:1 alcanzan concentraciones que representan aproximadamente la mitad de la de los ácidos grasos de los lípidos apolares del arenque del Atlántico (Ackman, 1979) mientras que la de C-18:1 es algo superior (22%) (Ackman y Eaton, 1966a).

En los peces de agua dulce el porcentaje total de ácidos monoenoicos está comprendido entre unos valores extremos del 17% en la perca amarilla (Perca flavescens) y un 44,2% en Aplo-



dinotus grunniens (Kinsella y col., 1977). El resto de las 18 especies estudiadas por estos autores presentan valores intermedios. Los tres tipos de truchas que analizan varían también ampliamente. La trucha arco iris (Salmo gairdnerii) alcanza un valor del 23,5%; Salvelinus fontinalis del 32,4 y la trucha de lago (Salvelinus namaycush) del 40,6%. El más abundante de los monoenoicos es siempre el C-18:1 (Kinsella y col., 1977; Ackman, 1967) que igualmente es también el mayoritario en todos los peces, si bien en la grasa de los marinos (Ackman, 1967) le sigue en importancia el C-16:1. En contraste con las especies marinas el C-22:1 se detecta en tasas inferiores al 1% (Ackman, 1967; Kinsella y col., 1977). En las truchas no se detecta el C-22:1 (Kinsella y col., 1977) ni en la fracción apolar (Fernández, 1977) ni como componente de los fosfolípidos (Fernández y Burgos, 1977).

El C-20:1 aunque se encuentra a concentraciones mayores que el C-22:1 (más del 1%), nunca llega a las tasas encontradas en la grasa de peces de origen marino en donde incluso puede alcanzar valores de hasta el 22,7% como en el capelán de Terranova (Mallopus villosus) (Ackman, 1979).

En las tres especies de truchas analizadas por Kinsella y col. (1977) el C-20:1 sólo se detecta en Salvelinus namaycush. Y en la fracción de Salmo fario estudiada por Fernández (1977),

o no se detecta o sólo alcanza concentraciones menores del 3%. La concentración que alcanza en la fracción lípidos polares procedente del músculo depende mucho de la época del año y del sexo (Fernández y Burgos, 1977) alcanzándose concentraciones de hasta el 10,9% en la lisofosfatidilcolina de hembras capturadas en el mes de Junio.

#### 1.4.1.3.3 Ácidos grasos poliénoicos

Los ácidos grasos poliénoicos son los que en realidad diferencian la grasa de los peces de la de otro origen biológico y son, por tanto, los que le confieren sus características peculiares. En general y comparando con otros tipos de grasa, puede afirmarse, que la del pescado posee cantidades relativamente abundantes de ácidos grasos poliénoicos, de una longitud de cadena mayor de 18 átomos de carbono. La suma de los ácidos grasos poliénoicos mayores de 18 átomos de carbono pueden suponer incluso más del 30% del total de los ácidos grasos. En contraste con la grasa del pescado, el porcentaje de dichos ácidos grasos en la grasa de la leche rara vez supera el 3% (Swern, 1964) localizándose siempre en los fosfolípidos (Morrison y col., 1965) y en los esfingolípidos (Morrison y Hay, 1970); en el tocino no llega al 1% aún cuando contiene un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados de 18 átomos de carbono

(Swern, 1964) y en los aceites vegetales predominan los ácidos grasos de 18 átomos de carbono con 1, 2 ó 3 dobles enlaces, salvo en el de colza que posee un alto porcentaje de erúcico. Así, en la grasa de semilla de soja el más abundante de estos tres ácidos grasos es el C-18:2, con valores próximos al 50%, careciendo de ácidos insaturados de más de 18 átomos de carbono (Swern, 1964).

Los ácidos grasos con 5 y 6 enlaces etilénicos proceden en parte de la dieta que, en el caso de los peces de origen marino, es el fitoplacton unicelular, en el que se ha detectado toda la serie de ácidos grasos insaturados presentes en la grasa de los peces (Ackman y col., 1968; Watanabe y Ackman, 1974; Ackman y col., 1974b; Ackman y col., 1970). Cuando los peces se alimentan con una dieta en la que participan grasas vegetales en las que predomina los ácidos C-18:2 y C-18:3, los animales no acumulan dichos ácidos grasos en concentraciones superiores al 2-5% lo que permite concluir que los peces utilizan estos ácidos grasos en parte como fuente energética y en parte para la formación, por elongación de la cadena, de los C-20:5 y C-22:6 (de Moreno y col., 1976). Han sido varios los investigadores que han estudiado la presencia del C-22:6 debido a que su concentración puede llegar, incluso al 20%, tanto en peces de agua dulce como de agua salada, (Stansby,

1969) y parece ser que este ácido graso constituye la etapa final de un proceso de elongación que probablemente es  $C-18:3w3 \rightarrow C-20:3w3 \rightarrow C-20:5w3 \rightarrow C-22:6w3$  (Owen y col., 1975; Tinoco y col., 1979).

En términos generales puede decirse que la grasa procedente de los peces de agua dulce presenta ácidos grasos polienicos similares a la de origen marino predominando siempre el  $C-22:6w3$  seguido del  $C-20:5w3$  y del  $C-18:2w6$  y  $C-18:3w3$  (Stansby, 1969).

Corrientemente las diferencias más claras de los ácidos grasos de los peces de origen marino y de agua dulce quizá estriben en la concentración que alcanzan ciertos ácidos grasos: Parece ser que los  $C-18:2$  y  $C-18:3$  alcanzan mayores niveles en los peces de agua dulce, en particular el  $C-18:3w3$ , que en los origen marino donde solo superan ligeramente el 1% (Ackman, 1979), mientras que en los peces de aguas continentales pueden llegar incluso a concentraciones del 6% (Kinsella y col., 1977). Otra característica que pudiera diferenciar la grasa de unos y otros animales es la cantidad de ácido  $C-20:5$  que en los peces de origen marino puede alcanzar concentraciones del 14% (Stansby, 1969) mientras que el valor normal de los de agua dulce está comprendido entre 5-7% (Stansby, 1969), aunque algunas veces llegue a tasas próximas al 10%, como en el caso de

Perca flavescens, Morone americanus y Catostomus commersonni (Kinsella y col., 1977). Es probable que estas diferencias se deban a la dieta, ya que como se ha dicho el C-20:5 es el ácido graso poliinsaturado dominante en el fitoplacton en donde alcanza concentraciones de hasta el 19% (Mori y Hikichi, 1976).

Kinsella y col., (1977) estudian la composición en ácidos grasos de 18 especies de peces de agua dulce, entre ellas tres tipos de truchas, Salvelinus fontinalis, Salvelinus namaycush y Salmo gairdnerii. De sus resultados se desprende, que en lo concerniente a los ácidos grasos poliénoicos no existen diferencias muy significativas y que el que siempre prevalece en las tres especies es el C-22:6w3, seguido de los C-20:5w3, C-20:4w6, C-18:3w3 y C-18:2w6 cuyas concentraciones son similares. La diferencia más significativa es que en Salvelinus namaycush el C-18:3w3 alcanza valores que son la mitad de los que presentan las otras dos especies de truchas.

No obstante, también ha descrito otros ácidos grasos poliénoicos cuyas concentraciones son mayores del 1%; en las tres especies encuentran otros ácidos grasos de la familia w3 (C-18:4w3, C-20:4w3 y C-22:5w3). Sin embargo, entre los de la serie w6 no detecta el C-22:5w6 en Salvelinus fontinalis, contrariamente a lo que ocurre en las otras dos especies de tru-

chas estudiadas, lo que contrasta con otras especies de peces de agua dulce en donde alcanza valores de hasta el 2% como en Salmo salar.

Se ha visto anteriormente que los ácidos grasos polienoicos son más abundantes en la grasa de los peces de agua dulce siendo el C-22:6 el que predomina. Por ello resulta realmente extraño que Fernández (1977) al estudiar los ácidos grasos de los triglicéridos de la grasa del músculo de Salmo fario, sólo detectase este ácido graso en muy pocas ocasiones y que sólo lo hallase en concentraciones significativas en los animales capturados en primavera en uno de los cotos. Similares consideraciones podrían hacerse respecto del C-20:5; en cambio, las concentraciones alcanzadas por el C-18:3 son algo más altas que las descritas por otros autores, llegando incluso hasta el 12,7%. Entre los ácidos grasos de lípidos polares es C-22:6, que en ocasiones alcanza concentraciones realmente altas, hasta del 45%, el que <sup>se</sup> detecta de una forma más regular (Fernández y Burgos, 1977).

#### 1.4.1.4 Influencia de la dieta en la composición en ácidos grasos

En los peces de vida silvestre, tanto de aguas marinas como continentales, la dieta influye poderosamente en la com-

posición de los ácidos grasos de los lípidos independientemente de cual sea el tejido de procedencia. Los peces marinos acumulan ácidos grasos poliénoicos de la serie w1, w4 u w7 que provienen de las algas del placton (Ackman, 1964; Ackman y col., 1968b; Ackman y McLachlan, 1977), lo que se ha usado para establecer los hábitos alimenticios de algunos peces, como el esturión (Acipenser oxyrinchus) (Ackman y col., 1975). En el mujol (Muqil cephalus) también se han encontrado (Deng y col., 1976; Schlenk, 1970) otros ácidos grasos poco corrientes procedentes de la dieta. Un fenómeno similar se da también en peces de agua dulce como el Osmerus mordax (Paradis y Ackman, 1976) que aunque contiene los ácidos grasos normales (Schlenk, 1970) , posee también un C-21:5 procedente de los invertebrados que le sirven de alimento..

Esto no sólo ocurre en los peces, sino que en mamíferos marinos también se observa un fenómeno similar, siendo el caso más evidente el de las ballenas del Atlántico Norte respecto de las del Antártico. En las primeras abundan las series C-22:1 cuya presencia guarda una estrecha relación con el contenido de estos ácidos grasos, sobre todo C-22:1w11, de los crustáceos de dichas zonas marítimas (Ackman y col., 1970); por el contrario, en las del Atlántico Sur (Antártico) la riqueza en dicho ácido graso es mucho menor ya que su principal alimento es el

krill (Eufasia superba) que contiene un 0,4% de C-22:1 (Mori y Hikichi, 1976).

No es fácil encontrar en la bibliografía trabajos que estudien la influencia de la dieta natural en los lípidos de Salmo gairdnerii de vida silvestre puesto que los individuos de esta especie se utilizan corrientemente para el cultivo industrial. Sin embargo si existen trabajos que se refieren a Salmo fario y el estudio de los mismos nos permite deducir las interrelaciones existentes entre dieta natural y composición en ácidos grasos de los lípidos musculares de la trucha. Quizá el trabajo más completo sea el de Fernández (1977) en el que se estudian las influencias estacionales en la composición del músculo de la trucha y de sus lípidos. Además del estado fisiológico del animal en cada época del año, es evidente que los alimentos naturales disponibles de cada estación varían e influyen de diversa forma<sup>en</sup> la composición del animal. Además este estudio se ha realizado en dos cotos del mismo río que son ecológicamente diferentes. En este sentido Hardy y Keay (1972) sugieren que las oscilaciones estacionales obedecen fundamentalmente a las sufridas por la abundancia de la dieta; apoya<sup>n</sup> esta hipótesis los datos relativos al contenido del tubo gastrointestinal de las truchas de vida silvestre (Alvarez, 1975) que demuestran que la dieta es muy rica y variada en los meses



de primavera - verano y precaria en los de invierno. En el caso de los triglicéridos musculares, las oscilaciones estacionales de ácidos grasos se traducen en los meses de verano en un incremento del grado de insaturación, debido sobre todo al aumento de los ácidos grasos poliénoicos. Igualmente los ácidos grasos poliénoicos decrecen por lo general, en los meses invernales. En cualquier caso (Fernández, 1977) concluye que no es posible establecer comparaciones en los ácidos grasos de los distintos fosfolípidos que sean válidas para todas las épocas del año, porque todos los ácidos grasos sufren profundos cambios que no obedecen a una pauta común.

El dato más llamativo de la composición en ácidos grasos de los triglicéridos de la grasa muscular de los animales de ambos cotos es el predominio de los ácidos grasos monoénoicos (C-16:1 y C-18:1), seguido del ácido saturado C-16; los poliénoicos alcanzan unos porcentajes muy bajos y el que prevalece en la mayoría de los casos es el C-18:3. Estos resultados contradicen totalmente los obtenidos por otros autores para los peces de agua dulce (Kinsella y col., 1977) en <sup>los</sup> que el C-20:5 y C-22:6 son siempre los poliénoicos mayoritarios. Estas discrepancias podrían justificarse teniendo en cuenta que el estudio de los ácidos grasos realizado por Kinsella y col. (1977) se refiere a la grasa total, mientras que el de Fernández (1977) estudia las diferentes fracciones aisladas. En los fos

Fosfolípidos las concentraciones mayores corresponden a los ácidos polienoicos que, sin embargo, oscilan mucho en sus valores extremos; por ejemplo, en el caso de la fosfatidiletanolamina del músculo se dan valores para el C-22:6 comprendidos entre, prácticamente 0 y 44,6%. Por citar otro ejemplo el C-16 alcanza valores que van del 44,9 al 7,7%; este último valor se equilibra en cierto modo con el sorprendente aumento del C-14 y C-12 que llega al 42 y 28% respectivamente.

Las influencias que la dieta ejerce en la composición de los ácidos grasos de los lípidos se han estudiado mucho más intensamente en experimentos planteados para controlar los aspectos nutritivos y económicos del cultivo de la trucha. La mayoría de estas experiencias se han realizado con Salmo gairdnerii, quizá por ser esta especie la más utilizada en la explotación industrial.

En relación con los fosfolípidos es necesario apuntar que son lípidos estructurales y muestran una menor variación en su composición global de ácidos grasos. Este hecho se ha demostrado en peces marinos como el bacalao (Gadus morhua) de ambos lados del Atlántico (Ackman y Burgher, 1964). Algo análogo acaece en los peces de agua dulce como han demostrado Shimma y Taguchi (1964) con ejemplares de Plecoglossum altivelis.

lis cultivados y de vida silvestre, en los que no observaron grandes variaciones en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos salvo en el caso del C-22:5 en los animales cultivados solo se detectaban a concentraciones traza, mientras que en los de vida silvestre se detectó un 4,4% que se compensaba con el C-22:6; lo que se ha interpretado diciendo que estos ácidos grasos son intercambiables (Ackman y Burgher, 1964).

En realidad la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos sólo se ve afectada cuando a los animales se les alimenta durante un periodo prplongado de tiempo con una dieta carente de/o pobre en grasa (Brenner y col, 1963; Reiser y col., 1963).

El trabajo realizado por Castell y col. (1972) con Salmo gairdnerii demuestra que los animales alimentados con dietas carentes de grasa sintetizan para incorporarlo a sus fosfolípidos un alto porcentaje de C-20:3w9, cosa que no ocurre en las truchas sometidas a alimentación natural (Kinsella y col., 1977). La adición de C-18:1 al pienso no mejora la situación pero tanto el linoleico como el linolénico a concentraciones tan bajas como el 1% de la dieta, hacen descender drásticamente el porcentaje de C-20:3w9 aumentando los de C-20:4w6 y

y C-22:5w6 o C-22:6w3, respectivamente, que son los ácidos grasos típicos de la trucha (Kinsella y col ., 1977). Ya se ha indicado anteriormente que los ácidos grasos linoleico y linolénico son esenciales para el normal fisiologismo de la trucha (Véase 1.2.1.2.3.). En opinión de Braekan y col. (1971) las variaciones cualitativas de los ácidos grasos corporales, como consecuencia del cambio de composición de los ácidos grasos de la dieta, suelen detectarse rápidamente. Higuera y col. (1976) opinan que después de la primera semana de recibir los animales una dieta definida, la grasa muscular inicia una tendencia significativa a semejarse en su composición en ácidos grasos a la dieta, aunque en el mismo trabajo señalan más tarde que la composición de ácidos grasos del tejido muscular alcanza valores intermedios entre los de las dos dietas diferentes que utilizaba a pesar de la enorme diferencia en ácidos grasos existentes entre ambas. Igualmente señalan que existe una mayor correlación entre ácidos grasos de la dieta y ácidos grasos musculares que entre aquéllos y los ácidos grasos hepáticos, lo que atribuyen a que el hígado metaboliza eficazmente el ácido linoleico.

Quizá el trabajo más esclarecedor sobre la influencia de la composición en ácidos grasos de la dieta en la del mús-

culo de Salmo gairdnerii sea el realizado por Yu y col. (1977). Dichos autores comparan la composición de ácidos grasos de la grasa muscular de tres grupos de truchas Salmo gairdnerii alimentadas con diferentes niveles de ácidos grasos, empleando como control una dieta con un 2% de aceite de arenque. El porcentaje proteico y el valor calórico de dichas dietas era el mismo. Como conclusiones más importantes señalan que el porcentaje total de los ácidos grasos saturados de los animales permanece prácticamente constante, en torno al 24% independientemente del grado de saturación de la dieta, lo que concuerda con las observaciones realizadas en Ictalurus punctatus (Stickney y Andrews, 1971) al que se le suministran dietas cuya saturación es del 41% y 25%, lo que en el animal produce un grado de saturación del 20%. Todo esto parece indicar que los peces poseen un mecanismo para regular y mantener el grado de saturación de la grasa corporal que, de acuerdo con diversas publicaciones (Roots, 1968; Knipprath y Mead, 1968; Kemp y Smith 1970), parece ser que está influenciado por la temperatura ambiente.

Otra de las conclusiones del trabajo de Yu y col. (1977) es que los ácidos grasos no retenidos por el pescado se metabolizan para la obtención de energía independiente-

temente de que sean saturados o no, lo que sugiere que todos los ácidos grasos están expuestos a ser metabolizados, excepto, los que se incorporan rápidamente a los fosfolípidos (Mead, 1968). Por ejemplo, en estos experimentos, el C-22:6w3 se incorporó y se retuvo en los fosfolípidos en todos los animales, independientemente de la dieta, lo que les lleva a sugerir que el ácido C-22:6w3 es esencial para el pescado, hecho que anteriormente habían demostrado Castell y col. (1972) quienes comprobaron que dicho ácido graso puede sintetizarse siempre que exista en la dieta una cantidad de C-18:3w3 próxima al 1% por elongación de la cadena pasando, presumible y previamente, por el C-20:3w3 y C-20:5w3 (Owen y col., 1975; Tinoco y col., 1979). No obstante, en el caso de los lípidos neutros, Castell y col. (1972) no detectaron cantidades apreciables de C-22:6w3 cuando la cantidad de linolénico de la dieta era la misma, ya que de hecho su nivel en los lípidos globales, tanto del hígado como del músculo, se ve influido por su contenido en la ración (Stickney y Andrews, 1971)

Finalmente, los resultados de Yu y col. (1977) confirman que los ácidos grasos de la dieta que se reflejan en la grasa muscular son los siguientes: C-14, C-16:1, C-18:2, C-20:1, C-18:4, C-22:1, C-20:4, C-20:5 y C-22:6.

1.4.1.5. Influencia de la temperatura en la composición de ácidos grasos

La totalidad de los ácidos grasos de los lípidos se modifica variando la temperatura, lo que constituye una característica de la mayoría de los poiquilotermos. Se admite generalmente que, a temperaturas bajas, aumentan corrientemente los ácidos grasos más insaturados (Reiser y col., 1963; Knipprath y Mead, 1966). Sin embargo, Stickney y Andrews (1971) han demostrado que en Ictalurus punctatus la temperatura ejerce escasos efectos en la composición de los ácidos grasos del hígado, aunque exista una tendencia a disminuir los niveles del C-22:6w3 y del C-20:5w6 al aumentar las temperaturas. La relación ácidos grasos poliinsaturados / saturados también suele disminuir al aumentar la temperatura.

El pescado de agua templada contiene mayores niveles de ácidos grasos saturados (Reiser y col., 1963; Lewis, 1962; Knipprath y Mead, 1966), lo que puede ser consecuencia de un efecto físico mediante el cual los poiquilotermos reducen su capacidad de aislar y metabolizar los ácidos grasos saturados al bajar las temperaturas. El efecto de la temperatura en la composición de los ácidos grasos del músculo es escaso.

En un estudio más completo realizado por Kemp y Smith (1970) con carpa dorada, se vió que las modificaciones en la composición de los ácidos grasos de los lípidos corporales no se alteraban por la temperatura, pero sí se observaron cambios marcados en la composición de ácidos grasos de los lípidos extraídos de la mucosa intestinal, especialmente en una fracción de membrana preparada a partir de homogeneizados de la mucosa intestinal. Al aumentar la temperatura a unos 20°C se redujeron a la mitad los porcentajes de C-20:1, C-20:4 y C-22:6 y se duplicaron los de C-18 y C-20:3. Los ácidos grasos de la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina eran los más sensibles a los cambios de temperatura, mientras que los del fosfatidilinositol y los de la fosfatidilserina se afectaban poco al variar la temperatura.

La razón de estos cambios en los fosfolípidos de las membranas intestinales pueden estar relacionados con la importancia de esta mucosa en la fisiología del animal a diferentes temperaturas.



### 1.5 La trucha como alimento

En general, el valor nutritivo del pescado depende en primer lugar y sobre todo de su gran contenido en proteína de alto valor biológico; dicha proteína contiene todos los aminoácidos esenciales para el hombre. El resto de los nutrientes, grasa, vitaminas y minerales aunque, de menor importancia, en comparación con las proteínas, también constituyen un aporte significativo de la dieta humana. Cuando se digieren las proteínas se liberan aminoácidos que el organismo humano utiliza para sintetizar sus propias proteínas estructurales, así como los enzimas y hormonas peculiares de la especie humana. Al mismo tiempo los aminoácidos mediante una serie de cambios también participan en las necesidades energéticas vitales para que el hombre pueda realizar sus funciones fisiológicas habituales.

Las proteínas del pescado al ser de alta calidad biológica son tan eficaces como las de otras procedencias, por ejemplo leche, huevos y carne para llevar a cabo dichas funciones: plásticas y energéticas.

Por otra parte, las pequeñas cantidades de nitrógeno no proteico existentes en el pescado juegan un papel importante en los procesos digestivos al estimular la secreción de los jugos gástricos y el apetito. Algunas de estas sustancias participan en la síntesis de otros compuestos como péptidos y aminoácidos libres y en la generación de energía.

La grasa del pescado, al igual que la de otros orígenes, tiene la misión fundamental de producir energía al metabolizarse en el organismo dando como productos finales  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La grasa del pescado aporta al mismo tiempo cantidades significativas de ácidos grasos insaturados principalmente linoleico, linolénico y araquidónico que se han considerado como esenciales para el organismo humano; su deficiencia afecta a: piel - (dermatosis, incremento de la permeabilidad al agua), circulación (disminución de la resistencia capilar e incremento de la permeabilidad de los capilares), al riñón (hemorragias intertubulares), pulmón (acumulación de colesterol), glándulas endocrinas (disminución de su funcionalidad), y a las funciones de reproducción y metabólicas (aumento del colesterol del hígado, disminución del colesterol plasmático, cambios en las mitocondrias hepáticas y cardíacas).

Las vitaminas del pescado son asimiladas por el hombre contribuyendo a la regulación del metabolismo. Las vitaminas A y D adquieren una peculiar importancia en el pescado.

Es difícil hacer una estimación general del valor global del pescado como alimento, dado que la forma de consumirlo y la cantidad corporal total del mismo que se consume varía con la especie y tamaño. No obstante, el valor alimenticio del pescado se estima habitualmente considerando sólo a la carne como material comestible, estableciendo su contenido en nutrientes básicos, principalmente proteínas y grasa total.

Para poder comparar el valor nutritivo del pescado con otros productos alimenticios es habitual comparar la cantidad de grasa, proteínas y el valor energético (KJ).

En el caso particular de la trucha con un 4,5% de grasa y un 20% de proteína el valor energético sería de 508 KJ. Comparando este valor con los valores medios de otros productos alimenticios (Paul y Southgate, 1979) se deduce que 100 g de carne de trucha proporcionan un contenido en proteínas similar a los que se obtienen de 100 g de carne de vacuno, cordero, cerdo y pollo y superior (aproximadamente el doble) al que aportan 100 g de huevo.

La grasa obtenida de 100 g de trucha es similar a la que aportan 100 g de pollo e inferior a la que contienen otros tipos de carne.

El contenido energético es similar al de la carne de pollo y un poco menor que el de los otros productos citados.

Puede concluirse que la carne de trucha es un alimento de la misma calidad nutritiva que otros productos alimenticios que habitualmente toma el hombre con la calificación de altamente nutritivos. Naturalmente es necesario tener en cuenta el aporte particular de ~~los~~ micronutrientes específicos de cada uno de estos productos, tales como hierro, calcio, vitaminas, etc.

### I.6 Justificación del trabajo

El desarrollo del cultivo de la trucha, como parte integrante de la acuicultura en general, obedece de una forma directa o indirecta a cinco factores: 1) aumento de la población mundial; 2) escasez en muchos países de proteína de alta calidad a un precio razonable; 3) producción pesquera marítima probablemente al límite de sus posibilidades; 4) producción agrícola que en muchas regiones del mundo no aumenta al ritmo necesario para satisfacer las necesidades nutritivas del crecimiento demográfico y 5) aumento de la demanda de alimentos de diverso origen y calidad, consecuencia del incremento del nivel de vida.

La acuicultura, en general, puede desglosarse en varias categorías dependiendo del criterio usado para su clasificación. La siguiente se basa en el objetivo final del esfuerzo acuicultural:

- 1.- Cultivo para la producción de alimentos
- 2.- Cultivos para mejorar los bancos naturales  
a través del reclutamiento y trasplante artificial
- 3.- Cultivo para la producción de pesca deportiva
- 4.- Cultivo de cebos para la pesca comercial y deportiva
- 5.- Cultivo de animales acuáticos como medio de  
recircular los desechos orgánicos

6.- Cultivo de animales acuáticos para la producción de productos industriales, tales como aceite, perlas, - piensos y medicamentos.

De todos estos objetivos finales sólo los tres primeros pueden ser satisfechos por el cultivo de las truchas, pero obviamente el primero es el principal.

La trucha ha sido considerada durante largo tiempo un artículo de lujo, no sólo en los núcleos de población alejados de los ríos trucheros, sino en las mismas localidades ri bereñas debido a la escasez de capturas. En los últimos años la situación ha cambiado notablemente debido al establecimiento de gran número de piscifactorías industriales.

En 1980 existían en España 222 centros de cultivo de truchas y su número sigue aumentando de forma progresiva.

La incidencia que la trucha tiene en la alimentación humana y la importancia de su cultivo en España puede deducirse teniendo en cuenta los datos recogidos en la Tabla I.1. Se observa que mientras las capturas de las aguas continentales han permanecido más o menos constantes durante el periodo 1977-80 el peso total de truchas cultivadas industrialmente casi se ha duplicado durante el mismo periodo. La tendencia actual es la de aumentar progresivamente, mucho más si se tie ne en cuenta las dificultades crecientes de la industria pes-

TABLA I.1

Piezas capturadas en aguas continentales <sup>▲</sup>

<u>Año</u>	<u>Número</u>	<u>Peso total (Tm)</u>	<u>Valor miles pts.</u>
1977	12.503.418	2.225	635.360
1978	12.884.190	2.512,4	672.168
1979	12.962.636	2.411,1	672.761
1980	13.067.143	2.409,9	824.908

Piezas producidas en piscifactorías industriales <sup>▲</sup>

<u>Año</u>	<u>Número</u>	<u>Peso total (Tm)</u>	<u>Valor miles pts.</u>
1977	31.366.277	5.981	1.179.727
1978	37.498.570	6.883	1.611.000
1979	48.897.090	9.625,3	2.495.486
1980	49.130.292	9.818,5	2.743.953

▲ Datos de 1977, 78 y 80 tomados del Anuario de estadística agraria del Ministerio de Agricultura.

Datos de 1979 tomados del Manual de estadística agraria del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

quera marítima.

Hechas estas consideraciones parece conveniente realizar todos los estudios posibles para mejorar las condiciones culturales tanto de las especies continentales como de las de origen marino. Así lo han entendido los organismos oficiales y recientemente han aparecido en el B.O.E. de 2-12-82 unas ayudas para promocionar la investigación sobre acuicultura.

En este sentido el cultivo de la trucha supone una gran ventaja ya que la infraestructura de las zonas e instalaciones de "cría" están netamente desarrolladas si se compara con el estado tan primitivo en que aún se encuentran las estructuras para el desarrollo de la acuicultura marina. Es posible que en el caso de las truchas lo más acuciante sea el perfeccionamiento de las dietas y el abaratamiento de las mismas con el fin de obtener los máximos rendimientos. En este sentido quizá lo más indicado sea la sustitución parcial de la proteína de los piensos por otros nutrientes (grasas e hidratos de carbono) que sólo posean valor energético y, al tiempo, su valor económico sea bajo.

El presente trabajo constituye un intento de esta naturaleza referido a subproductos de la industria alimentaria española como el orujo de aceituna y la grasa técnica de matadero.

La finalidad de este trabajo es estudiar las modifica-

ciones experimentadas por los animales en relación con su peso, talla, composición lipídica y palatabilidad al enriquecer los piensos comerciales con un ingrediente fundamentalmente graso lo que acarrea una disminución del contenido proteico de la ración y, evidentemente, una disminución del coste de los precios de los piensos.

Al realizar un estudio de esta naturaleza es normal hacerlo en acuarios experimentales, de unos 500 a 1000 litros en los que se controla perfectamente la oxigenación, temperatura, etc. Evidentemente las condiciones experimentales a las que se somete al animal son óptimas. Sin embargo, los resultados obtenidos no pueden extrapolarse en su totalidad cuando el cultivo se realiza de una forma industrial en las piscifactorías, en las que las condiciones ambientales no se pueden ni prever ni controlar adecuadamente, sobre todo, en lo referente a la temperatura del agua que depende única y exclusivamente de las condiciones climáticas y que influye mucho en la fisiología de la trucha.

En estas experiencias se han utilizado los estanques de una explotación industrial de truchas y las condiciones empleadas han sido idénticas a las que el animal va a encontrar durante su cultivo. La única diferencia entre las condiciones de este trabajo y la explotación industrial de truchas ha sido la densidad de población, sensiblemente menor a la habitual. El



autor no es ajeno a los efectos de este factor sobre el desarrollo de las truchas, pero se ha considerado que su influencia es mínima en comparación con el resto de los factores que se han mantenido iguales a los de la explotación industrial.

La especie de trucha utilizada en esta experiencia ha sido Salmo gairdnerii, debido a que es la que se explota normalmente con fines industriales en las piscifactorías españolas.

Por todo ello creemos que las conclusiones derivadas de este trabajo son totalmente extrapolables a la hora del empleo de los piensos formulados con fines industriales.

## II. MATERIAL, PRODUCTOS Y METODOS

### II.1. Material

#### II.1.1. Material biológico

Las truchas utilizadas en este estudio pertenecían a la especie Salmo gairdnerii, con una edad, al principio de las experiencias, de aproximadamente un año.

#### II.1.2. Material empleado en la cría de las truchas

Los estanques usados para la realización de las experiencias descritas en esta tesis fueron tres: uno para cada lote.

Todos ellos tenían las siguientes dimensiones: 9 x 1 x 0,6 m. El volumen de agua que contenían eran las 3/4 partes de su capacidad total, es decir, unos 4 m<sup>3</sup>.

#### II.1.3. Material general de laboratorio

La destilación del agua utilizada para la preparación de las disoluciones acuosas se realizó en un aparato Afora (1). Tras la destilación del agua, se la hizo pasar por un desmineralizador "Seta" mod. R-600.

Las pesadas de precisión se efectuaron en balanzas analíticas "Sartorius" mod. 2443 y "Microwe" mod. 6620. Para las pesadas ordinarias se emplearon granatarios "Ohaus" de triple brazo y balanzas monoplato "Sauter" mod. S.1000.

Las homogeneizaciones de las muestras tuvieron lugar en un triturador de cuchillas Sorvall Omni - Mixer 17106.

(1) La cita de marcas de aparatos, reactivos, etc., no significa que el autor las recomiende con preferencia a otras marcas del mercado.

Para la observación de manchas fluorescentes se empleó una lámpara de rayos ultravioleta "Uvaton" que opera a dos diferentes longitudes de onda: 254 y 360 nm.

Las muestras se conservaron en arcones de congelación "Kelvinator" mod. AC-550, frigoríficos "Philips" y "Aspes" y cámaras frigoríficas "Frikey" construidas para tal fin por un proveedor local.

Las cromatografías en columna se efectuaron en columnas de vidrio "Afora" provistas de placa filtrante de vidrio y llave de teflón.

La cromatografía en capa fina se realizó con placas cuyo soporte se repartía uniformemente con un aparato "Quickfit", utilizando para su desarrollo cubetas "Desaga".

Para la cromatografía en fase gaseosa se empleó un cromatógrafo "Perkin-Elmer" mod. F-11, provisto de ionizador de llama, programador lineal de temperaturas y registrador "Perkin-Elmer" 165.

Las determinaciones colorimétricas se hicieron inicialmente con un espectrofotómetro de doble haz "Beckman" mod. DBG7 y después con un espectrofotómetro "Kontron" mod. Uvikon 820. La espectrofotometría en la zona infrarroja se llevó a cabo en un aparato "Perkin-Elmer" mod. 580.

Las liofilizaciones se realizaron en un aparato "Terruzzi-Mevilsa" mod. TP-3 con superficie útil de carga de 0,3 m<sup>2</sup>,

dotado de equipo de registro, dispositivo de termovació y programador.

En la preparación de las muestras para las pruebas de degustación se usó un horno de microondas "Philips" mod. 2010 C.

Se ha utilizado también material general de laboratorio: estufas y baños de calentamiento, pHmetros, agitadores, etc.

#### II.1.4. Concentración de volúmenes

Las concentraciones de volúmenes relativamente grandes de disolventes orgánicos se efectuaron en un rotavapor "Buchi" mod. EL, equipado con un dispositivo de elevación y acoplado a un baño maría. Los pequeños volúmenes de disolventes orgánicos ( menos de 25 ml. ) se eliminaron total o parcialmente mediante corriente de nitrógeno.

#### II.2. Productos

##### II.2.1. Reactivos

Todos los productos químicos utilizados en este trabajo fueron de calidad reactivo suministrados por Panreac, Merck, Baker.

Los patrones empleados fueron suministrados por Sigma.

### II.2.2. Soportes cromatográficos y purificación de los mismos

Los soportes cromatográficos utilizados, tanto para las cromatografías en columnas como en las de capa fina, fueron suministradas por Merck, excepto el ácido silícico que lo fué por Mallinckrodt y la celita por Johns Manville. La sílica gel G-60 se purificó antes de su empleo con una mezcla de cloroformo-metanol (2/1)(v/v) con el fin de eliminar el material orgánico que contenía. Para ello se utilizó la técnica descrita por Hardy y Mackie (1969), para lo cual se empaquetó una columna cromatográfica y se eluyó con una mezcla de cloroformo-metanol (2/1) (v/v). A continuación se extrajo de la columna el soporte, y los restos de cloroformo-metanol se eliminaron con benceno que, a su vez, se eliminó mediante filtración a vacío en embudo Büchner y posterior calentamiento a 110°C en una estufa de desecación.

El ácido silícico y la celita se purificaron después de mezclados en la proporción 1/1 (p/p), mediante percolación de la mezcla con un volumen apropiado de metanol.

Como soporte para la cromatografía en fase gaseosa se empleó "Chromosorb W" impregnado de Dietilen-glicol-succinato al 10%.

La cromatografía en papel se realizó con papel "Whatman" nº1 y se desarrolló en sentido descendente.

### II.2.3. Disolventes y purificación de los mismos

Los disolventes utilizados en las extracciones y cromatografías fueron cloroformo (Probus), Acetona (Panreac), metanol (Panreac), éter etílico (Probus) y éter de petróleo 40º-60º (Carlo Erba).

Todos los disolventes, incluso los de alta pureza analítica contienen siempre impurezas aunque sea a nivel de trazas. Como se necesitan siempre grandes cantidades de los mismos para obtener pequeñas cantidades de lípidos, pueden originar contaminaciones serias. Por ello los disolventes que se utilizan en mayores volúmenes se sometieron a purificación en el laboratorio.

El cloroforme se purificó por destilación fraccionada, utilizando una columna de rectificación de Vigreux y eliminando, como es normal, las fracciones de cabeza y cola.

La acetona se purificó de acuerdo con la metodología descrita por Fernández (1977). Para ello se le adicionó una pequeña cantidad de  $KMnO_4$  hasta persistencia del color violeta. El agua contaminante se eliminó por la adición de  $K_2CO_3$  anhidro; seguidamente se filtró con placa de vidrio de porosidad 2 (40-90  $\mu m$  de diámetro) y se destiló fraccionadamente.

El éter etílico se deshidrató adicionándole alambre de sodio preparado por extrusión en una prensa. Antes de su uso se liberó de peróxidos destilándolo con polvo de hierro reducido.

Los disolventes que no se sometieron a destilación (benzeno, éter de petróleo, etc. ) eran de calidad analítica y nos fueron suministrados por Merck, Baker y Carlo Erba.

#### II.2.4. Disolventes para espectrofotometría infrarroja

Los disolventes utilizados en espectrofotometría infrarroja (disulfuro de carbono y cloroformo) fueron los que elabora Merck para tal fin.

#### II.2.5. Gases

El nitrógeno utilizado para evaporar los solventes orgánicos fué suministrado por la S.E.O.. Los empleados para cromatografía de gases ( $N_2$ , aire e hidrógeno), todos ellos de alto grado de pureza, fueron igualmente suministrados por la S.E.O..

### II.3. Métodos

#### II.3.1. Preparación de los piensos

A partir de un pienso comercial para truchas, autorizado por el Ministerio de Agricultura, se prepararon dos tipos de piensos que se han denominado Experimental OR (Exp.OR) y Experimental GT (Exp.GT). El Exp. OR era el pienso Comercial al que se le añadía un 11% de torta de orujo de aceituna. El Exp. GT era similar al anterior, pero sustituyendo la torta de orujo de aceituna por grasa técnica de matadero. Como Control se utilizó el mismo pienso Comercial.

En ambos casos los piensos Experimentales se prepararon en el laboratorio de la forma siguiente: el granulado en que viene preparado el pienso Comercial se rehidrató parcialmente mediante adición de agua y a continuación se añadió la cantidad correspondiente de torta de orujo de aceituna, o de grasa técnica de matadero. Posteriormente se mezcló en una amasadora y la pasta resultante volvió a granular con una máquina apropiada. El exceso de agua se eliminó aplicando conjuntamente vacío y congelación, para lo cual se utilizó un liofilizador semiindustrial.

#### II.3.2. Condiciones ambientales del agua

Los estanques utilizados para la cría de las truchas (véase II.1.2.) se limpiaron y desinfectaron cuidadosamente antes de las experiencias y se llenaron con agua natural. Dichos estanques cuentan con un dispositivo que permite la renovación continua del agua, con lo que los animales tienen asegurada la oxigenación de la misma.

Durante todo el tiempo que duraron las experiencias se midió la temperatura del agua dos veces al día, una por la mañana y otra al atardecer.

Los animales dispusieron en todos los casos de espacio suficiente, dado que los estanques contenían un volumen cercano a los 4 m<sup>3</sup> de agua y el número de animales no sobrepasó nunca los 200.



Las partículas procedentes de restos del alimento, de excrementos y otras sustancias procedentes del medio exterior, se eliminaron diariamente.

Aunque la piscifactoría en que se realizaron las experiencias dispone de mecanismo para el bombeo del agua, nunca fué necesario utilizarlo debido a la abundancia de agua en la época de trabajo (Marzo-Junio).

#### 11.3.3. Procedencia y selección de los animales

Las truchas que se han utilizado en este trabajo procedían de una piscifactoría del Instituto para la Conservación de la Naturaleza ( I.C.O.N.A. ) situada en Iruelas (Avila). Dicho Organismo puso a nuestra disposición los animales y estanques necesarios para el mantenimiento de tres lotes de unas 150 truchas por lote durante el tiempo que duraron las experiencias.

Del estanque original de I.C.O.N.A., donde estos animales están sometidos a una explotación y manejo semiindustriales, se tomaron al azar truchas (de un año de edad aproximadamente) suficientes para la preparación de 4 lotes diferentes de 150 animales; 3 de ellos se colocaron en los correspondientes estanques y se alimentaron con los piensos programados y el cuarto lote se transportó al laboratorio y sirvió para la experiencia del día cero.

Para identificar rápidamente cada lote de truchas se ha utilizado la nomenclatura que a continuación se expone, basada

en la alimentación recibida por cada lote y en el número de días que estuvieron sometidos a la misma.

Inicial: lote de truchas común para los otros tres, a partir de los que se iniciaron las experiencias. Estas truchas estaban siendo alimentadas todas con un pienso comercial.

C : lote Control, alimentado con pienso Comercial.

OR: lote alimentado con pienso Comercial al que se le añadió un 11% de torta de orujo de aceituna.

GT: Igual que el anterior pero sustituyendo la torta de orujo de aceituna por grasa técnica de matadero,

El número ( 45, 70 ó 100 ) a continuación de las siglas anteriores indica los días que estuvieron alimentadas con la dieta correspondiente. Ejemplo: OR-70 indica que los animales se alimentaron con el pienso adicionado de torta de orujo de aceituna durante 70 días.

#### 11.3.4. Obtención, transporte y preparación de las muestras

Los animales se mantuvieron en los estanques alimentándose ad libitum con los piensos correspondientes. Transcurridos 45, 70 y 100 días se tomaron muestras constituidas por alrededor de medio centenar de ejemplares de cada lote, incluido el Control.

Una vez muertas las truchas, se transportaron inmediatamente al laboratorio en condiciones de refrigeración (recubier

tas de hielo ); a su llegada, se pesaron y tallaron. A continuación se evisceraron, se descabezaron y se separó la totalidad del tejido muscular del esqueleto, salvo la pequeña porción que queda adherida a espinas y piel. El conjunto de la musculatura procedente de la totalidad de los individuos de cada lote se mezcló con ayuda de un homogeneizador manual. De cada lote se obtuvo una cantidad de homogeneizado que nunca alcanzó valores inferiores a 1 Kg.. El homogeneizado se conservó en congelación (  $-25^{\circ}\text{C}$  ) hasta el momento de su uso.

#### II.3.5. Medida y pesada de las truchas

Antes de la extracción del músculo se procedió a determinar el peso y el tamaño de cada individuo. La longitud, medida desde la porción labial anterior hasta la parte distal de la aleta caudal, se expresó en cm..

El peso se determinó en una balanza-granatario con una precisión de  $\pm 0,1$  g..

#### II.3.6. Métodos químicos

##### II.3.6.1. Obtención de la muestra

Todas las determinaciones y/o extracciones se hicieron a partir de alícuotas procedentes de los homogeneizados obtenidos según se describe en II.3.4.. Las determinaciones químicas realizadas en los piensos se hicieron a partir de alícuotas de los mismos.

#### II.3.6.2. Determinación del extracto seco

Se realizó por desecación en estufa a 110°C hasta peso constante.

#### II.3.6.3. Determinación del contenido en grasa

La materia grasa total del músculo y de los piensos se determinó gravimétricamente tras la extracción de la misma por el método de Folch y col. (1957). Para ello, la muestra se trituró y mezcló con 20 volúmenes de cloroformo-metanol (1/1)(v/v) en un homogeneizador Sorvall Omni-Mixer 17106 durante 5 minutos. El homogeneizado final se centrifugó (2.000 g) y al sobrenadante se le adicionó cloroformo hasta dar una mezcla de cloroformo-metanol (2/1)(v/v). Los extractos en cloroformo-metanol se reunieron y se lavaron con un volumen suficiente de una solución acuosa de NaCl al 0,9% para que la proporción cloroformo-metanol-solución salina fuera de 2/1/0,75 (v/v/v).

La mezcla se agitó vigorosamente en un embudo de decantación, despreciándose la fase acuosa (superior). La fase inferior (rica en cloroformo) se lavó tres veces con 0,5 volúmenes de una mezcla de cloroformo-metanol-solución salina en la proporción (3/48/47) (v/v/v).

El extracto lipídico se obtuvo evaporando los disolventes, a sequedad en rotavapor y se mantuvo a vacío en un desecador hasta pesada constante. El extracto lipídico así obtenido

se almacenó a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta sus posteriores análisis.

#### II.3.6.4. Determinación de proteína

El contenido proteico se estimó determinando el nitrógeno total por el método de Kjeldahl; para ello se efectuó primero una macrodigestión de una alícuota de la muestra (aproximadamente 3 g.) en presencia de 20 ml. de ácido sulfúrico concentrado, utilizando como catalizador 8 g. de la siguiente mezcla:

- 96% de sulfato sódico anhidro
- 3,5% de sulfato de cobre
- 0,5% de dióxido de selenio

Los matraces de digestión con la muestra, el ácido sulfúrico, el catalizador y 4-8 perlas de vidrio se calentaron en una batería durante el tiempo necesario para que la digestión fuera completa (aproximadamente de 4 a 6 horas). El líquido obtenido se traspasó a un matraz aforado de 100 ml., se lavó el matraz empleado en la digestión con pequeños volúmenes de agua destilada (2 veces) y finalmente se enrasó con agua destilada. Se tomaron alícuotas de 10 ml. que tras su alcalinización con NaOH se utilizaron para arrastrar el  $\text{NH}_3$  en corriente de vapor; el amoníaco se recogió con ácido bórico al 2% y se tituló con ácido clorhídrico 1/50 N, utilizando como indicador rojo de metilo y verde de bromo-cresol.

El porcentaje en proteína se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ proteína} = \frac{V \times N \times 14,007 \times 6,25 \times 1000}{\text{mg. de muestra}}$$

V = ml. de HCl empleados

N = normalidad del HCl

#### 11.3.6.5. Determinación de la fibra bruta

El análisis de la fibra bruta por el método de Weende (González, 1981) es una valoración convencional, de valor relativo, que determina el residuo que persiste después de dos hidrólisis sucesivas de la muestra, una ácida y otra alcalina: ésta fracción, considerada como la parte menos digestible de los alimentos, está constituida por una mezcla de celulosa, lignina, cutina y suberina principalmente.

Se depositó 1 g. de muestra en un matraz y se añadieron 50 ml. de ácido sulfúrico 0,3 N y unas gotas de octanol. Se puso el matraz a hervir a reflujo, regulando la temperatura de manera que la ebullición comenzara a los 4-5 minutos, manteniéndose ésta durante 30 minutos más y una vez transcurrido éste tiempo se añadieron 25 ml. de hidróxido sódico 1,5 N. Esta nueva mezcla se sometió de nuevo a ebullición a reflujo durante otros 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se filtró con ayuda de vacío por un crisol de placa de vidrio porosa del Nº 1; el filtrado se lavó repetidas veces con agua destilada caliente (unos 90°C); a continuación se lavó dos veces más con acetona, se secó en la estufa, se enfrió y pesó. Inmediatamente, se incineró a 500-600°C, se enfrió y pesó. La diferencia entre las dos pesadas es la fibra bruta.

#### II.3.6.6. Determinación de cenizas

La determinación de cenizas se realizó por pesada tras la incineración de la muestra a 500-600°C en un horno-mufla.

#### II.3.6.7. Determinación de los Extractivos Libres de Nitrógeno (E.L.N.)

Los extractivos libres de nitrógeno (E.L.N.) constituyen la fracción que se solubiliza durante el tratamiento químico efectuado en la determinación de la fibra bruta y engloba principalmente a los mono, di y polisacáridos más los ácidos orgánicos que se obtienen al extraer la grasa.

Se calculó de una forma indirecta restando de 100 la suma de la humedad, proteína, grasa, fibra bruta y ceniza de la muestra.

#### II.3.7. Metodología lipídica

##### II.3.7.1. Obtención de la muestra

La muestra destinada al estudio de los componentes lipídicos del músculo estaba constituida por alícuotas procedentes del extracto lipídico obtenido para la determinación del contenido en materia grasa total (véase II.3.6.3.). El extracto lipídico procedente del pienso se utilizó también para el estudio de sus componentes (véase II.3.6.3.).

#### II.3.7.2. Fraccionamiento de los lípidos en columna de ácido silícico/celita.

##### a) Preparación de las columnas

Una cantidad apropiada de la mezcla de ácido silícico/celita purificado según se describe en II.2.2. se depositó en un mortero y se añadió un volumen adecuado de cloroformo, mezclándose perfectamente; la suspensión obtenida se vertió, con la ayuda de más cloroformo, en una columna cromatográfica de 2,5 x 100 cm. manteniéndose en el soporte cromatográfico una relación de altura / diámetro próxima a 25.

##### b) Colocación de la muestra

La muestra a cromatografiar se pesó, se disolvió en la mínima cantidad de cloroformo y se depositó cuidadosamente sobre el lecho cromatográfico, teniendo la precaución de que siempre existiera encima del último un pequeño volumen de disolvente. La relación muestra / soporte, es en todos los casos, de alrededor de 1 / 40.

##### c) Desarrollo de la cromatografía

Las diferentes fracciones lipídicas se eluyeron con tres fases móviles, de acuerdo con el método de Vorbeck y Marinetti (1965): cloroformo, para arrastrar los lípidos neutros (25 ml. por gramo de soporte); acetona, para eluir lípidos de mayor polaridad que los neutros (20 ml. por gramo de soporte); y metanol, para arrastrar los lípidos más polares (25 ml. por gramo de soporte).



Durante el desarrollo de las cromatografías, tanto la columna como las fracciones recogidas se protegieron de la luz.

Las fracciones eluidas se evaporaron a sequedad y se registró su peso.

#### II.3.7.3. Fraccionamiento de los lípidos apolares

##### a) Fraccionamiento en columna de ácido silícico / celita:

Dado que los triglicéridos constituyen un alto porcentaje de la fracción lípidos apolares (alrededor del 75%) es difícil obtener por capa fina cantidades sustanciales de otras fracciones lipídicas que formen parte de ésta fracción. Por ello se realizó una cromatografía preparativa en columnas de ácido silícico / celita modificando la técnica original descrita por Hirsch y Ahrens (1958) quienes opinan que aumentando progresivamente el porcentaje de éter etílico en hexano, que actúa como fase móvil, se separan perfectamente los monoglicéridos, diglicéridos, colesterol, triglicéridos, ésteres del colesterol e hidrocarburos.

La modificación a la técnica consistió en adicionar al ácido silícico una cantidad igual de celita con el fin de que aumentara el flujo de la columna.

La preparación de la columna se realizó de la misma forma que en II.3.7.2. salvo que la suspensión del soporte y la disolución de la muestra se hizo con hexano.

Una vez colocada la muestra (aproximadamente 10 mg./g. de soporte) se eluyó primero con hexano /éter etílico (97/3) (v/v) (5 ml./g. de soporte) y finalmente con cloroformo (5 ml./g de soporte). Utilizando este sistema de elución se consigue aislar los triglicéridos casi totalmente ya que se eluyen con el hexano/éter etílico, quedando así enriquecidos el resto de los lípidos apolares.

**b) Fraccionamiento por cromatografía en capa fina:**

b.1.- Preparación de la placa: se utilizaron placas de vidrio de 20x20 cm.. Las placas previamente lavadas con detergente y abundante agua, y tras su secado a 100°C, se cubrieron con una capa de sílica gel G-60 purificada según se describe en II. 2.2.. Para ello, se mezclaron en un Erlenmeyer 30 g. de sílica-gel G-60 con 40 ml. de agua destilada; se formó una suspensión homogénea y se le añadieron 20 ml. más de agua destilada. Después de agitar unos 60 segundos se depositó la pasta en el recipiente que a tal fin posee el aparato de recubrimiento de placas que suministra "Quickfit".

Formada la capa fina las placas se mantuvieron al aire durante unos 5 minutos y posteriormente se introdujeron en una estufa a 110°C donde permanecieron unos 30 minutos. El grosor final de la capa soporte fué de 0,5 mm. (con fines preparativos) y de 0,25 mm. (con fines analíticos).

b.2.- Colocación de la muestra: disueltas las muestras de forma apropiada, se depositaron cuidadosamente en la superficie de la capa de sílica gel G-60 a unos 2 cm. del borde de la placa

(línea de origen) procurando no dañar la superficie de la capa.

b.3.- Desarrollo de la cromatografía: una vez aplicada la muestra en la línea de origen se llevaron las placas a la cubeta cromatográfica. En este caso, lípidos apolares, la fase móvil empleada fué éter de petróleo / éter etílico / ácido acético (80/20/1 (v/v/v)).

II.3.7.4. Fraccionamiento de los lípidos polares y de la fracción eluida con acetona

Se realizó por cromatografía en capa fina de sílica gel G-60 empleándose para el desarrollo una fase móvil constituida por cloroformo / metanol / agua (65/25/4) (v/v/v).

II.3.7.5. Identificación de los diferentes componentes lipídicos

El revelado de las placas se efectuó rociándolas con diferentes reactivos, unos generales y otros específicos, con el fin de visualizar los distintos componentes separados por cromatografía:

a) Reactivos generales:

1.- Ácido sulfúrico: se rociaron las placas con una disolución acuosa de  $H_2SO_4$  al 50% (v/v) y se sometieron luego a una temperatura de  $100^\circ C$ , durante unos 30 minutos. Las manchas aparecen de color negro, excepto el colesterol y sus ésteres que toman una coloración violeta.

2.- Reactivo de Iodo: se rociaron las placas con una solución clorofórmica de Iodo al 1% (p/v) o bien se colocaron en una cubeta saturada de Iodo. Los lípidos que poseen dobles enlaces aparecen de color amarillo.

3.- Reactivo de diclorofluoresceína: se rociaron las placas con una disolución de diclorofluoresceína al 0,1% (p/v) en metanol del 95%. Los lípidos aparecen como manchas amarillas brillantes bajo la luz ultravioleta.

b) Reactivos específicos:

1.- Reactivo de ninhidrina: se utilizó para detectar los grupos amino y se preparó siguiendo la técnica descrita por Wagner y col. (1961). Para ello, se disolvió la ninhidrina al 0,2% en una mezcla de butanol / ácido acético al 10% (95/5)(v/v). Las placas se rociaron con este reactivo y se calentaron a 110°C durante unos minutos, hasta la aparición de un color rojo violeta demostrativo de la presencia de grupos amino.

2.- Reactivo de Dragendorff modificado (Wagner y col., 1961): empleado para detectar compuestos de colina. Esta constituido por dos soluciones:

- solución I: solución acuosa de Ioduro potásico al 40%.

- solución II: solución de subnitrito de bismuto al 1,7% en ácido acético al 20%.

El reactivo se preparó inmediatamente antes de su uso, mezclando las soluciones I y II con agua en la proporción (1/4/15) (v/v/v). Después de rociar la placa, los lípidos que contienen colina aparecen, al cabo de unos minutos, como manchas anaranjadas.

3.- Reactivo de azul de molibdeno: los ésteres fosfato se evidenciaron mediante la modificación de Dittmer y Lester (1964) de la técnica original de Zinzadze. Para ello fué necesario preparar dos tipos de soluciones:

- solución I:  $\text{MoO}_3$  al 4,011% en ácido sulfúrico 25 N (es necesario calentar a la llama de un mechero Bunsen para disolver la totalidad de  $\text{MoO}_3$ ).

- solución II: molibdeno en polvo al 0,365% en la solución I. Para disolver el molibdeno es necesario calentar a la llama.

El reactivo final se preparó mezclando las soluciones I y II con agua en las proporciones (1/1/2)(v/v/v).

Este reactivo es estable durante meses a la temperatura ambiente. Las manchas que contienen ésteres fosfato adquieren de inmediato un color azul.

4.- Reactivo de periodato de Schiff: se emplea para detectar la presencia de hidratos de carbono en los lípidos y cualquier otro compuesto que posea grupos -OH adyacentes. Está constituido (Shaw, 1968) por:

- solución acuosa de periodato sódico al 1%

- dióxido de azufre, obtenido haciendo reaccionar ácido sulfúrico con bisulfito sódico.

- reactivo de Schiff: disolución acuosa de para-rosanilina al 1% decolorada al burbujear dióxido de azufre durante 30-40 minutos. Las placas, una vez desarrolladas, se rociaron primero con una solución de periodato sódico; al cabo de unos 10 minutos el exceso de periodato se eliminó con  $\text{SO}_2$ . Finalmente se pulverizaron con el reactivo de Schiff.

Los glicolípidos y lípidos con -OH adyacentes toman un color azulado que aumenta a medida que pasa el tiempo.

#### 5.- Reactivo para los ácidos grasos libres

(Dudzinski, 1967): Está constituido por:

- 2'- 7'-diclorofluoresceína al 1% en metanol del 95%

- solución etanólica de cloruro de aluminio al 1%.

- solución acuosa de cloruro de hierro al 1%.

Se rociaron las placas con los diferentes reactivos en el orden indicado, calentando suavemente (alrededor de  $40^\circ\text{C}$ ) después de la adición de cada reactivo.

Los ácidos grasos libres toman un color rosa - violeta.

6.- Reactivo para el colesterol y ésteres del colesterol (Lowry, 1968): constituido por  $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 0,05% en una mezcla de agua / ácido acético / ácido sulfúrico (90/5/5) (v/v/v).

Se rociaron las placas con el reactivo y se calentaron durante 2 - 3 minutos a  $100^\circ\text{C}$ .

El colesterol y sus ésteres aparecen como manchas de color rojo-violeta. El colesterol se hace visible antes que sus ésteres.

Un método alternativo es utilizar como reactivo general ácido sulfúrico al 50%. Tanto el colesterol como sus ésteres aparecen de color violeta.

7.- Reactivo para tocoferoles: constituido por una solución etanólica de 2 - 2'dipiridilo al 0,5% y  $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 0,2%. Los tocoferoles toman una tonalidad rojiza.

#### II.3.7.6. Cromatografía en papel de los productos de hidrólisis de la fracción eluida con acetona

a) Hidrólisis: se llevó a efecto en las muestras de la fracción eluida con acetona en la cromatografía en columna de ácido silícico / celita (1/1)(p/p). Para ello, se colocaron alícuotas en tubos de vidrio (0,70 cm. de diámetro) disueltas en cloroformo / metanol (2/1)(v/v). Tras la evaporación a sequedad bajo corriente de nitrógeno, se añadieron unos 2 ml.

de HCl 2 N y el tubo se cerró a la llama exponiéndose después a la acción del calor (110°C) durante 3 horas.

b) Cromatografía: la muestra hidrolizada se sometió a desecación eliminando a vacío el HCl; se disolvió en una pequeña cantidad de agua destilada que posteriormente se cromatografió en tiras de papel Whatman nº1, utilizando la técnica descendente en una fase móvil constituida por n-butanol/piridina/agua (6/4/3)(v/v/v). Se dió por concluida cuando el frente del disolvente había recorrido más de 40 cm.

c) Revelado: los papeles se secaron en corriente de aire caliente y se revelaron, uno con el reactivo de periodato de Schiff (véase II.3.7.5.4.) y otro con el reactivo del nitrato de plata (Trevelyan y col., 1950). Para ello, se pasó el papel 1º) por una cubeta que contenía 0,5 ml. de una disolución acuosa saturada de nitrato de plata que se diluyó hasta 100 ml. con acetona; a esta disolución se le había añadido agua, gota a gota, hasta redissolver el precipitado 2º) por otra cubeta que contenía 5 ml. de NaOH al 40% en 100 ml. de etanol y 3º) por un recipiente con tiosulfato sódico al 5%. El papel se lavó, finalmente, con abundante agua destilada. Los azúcares que contienen grupos reductores adquieren una totalidad negruzca.

#### II.3.7.7. Aislamiento de los diferentes componentes lipídicos caracterizados por cromatografía en capa fina

Con el fin de obtener una cantidad suficiente que permisi-



ta su cuantificación precisa, se hicieron cromatografías preparativas en capa fina de sílica gel G-60 de 0,5 mm. de espesor.

La muestra se colocó en una banda a unos 2 cm. del borde de la placa, se dispuso en la cubeta y se desarrolló con la fase móvil correspondiente (véanse II.3.7.3. y II.3.7.4.)

Una vez finalizada la cromatografía se localizaron las diferentes fracciones (aparecen en bandas de diferentes contornos más o menos regulares) que sufrieron diferentes tratamientos dependiendo del destino posterior:

1.- Para fines cuantitativos se revelaron con el reactivo de Iodo (véase II.3.7.5.)

2.- Cuando el destino era el aislamiento para el estudio de su composición en ácidos grasos se utilizó el reactivo de la diclorofluoresceína (véase II.3.7.5.) según recomendaciones de Christie (1973).

En ambos casos, con ayuda de una espátula, se procedió a separar la porción de sílica gel ocupada por cada sustancia de la placa de vidrio. El polvo obtenido, en cuyas partículas están adsorbidos los lípidos, se depositó en un papel de filtro situado en un embudo "Millipore" dotado de placa filtrante. Este sistema se colocó en la boca de un matraz "Kitasato" y con ayuda de vacío los lípidos se extraerón del sílica gel percolando una mezcla de cloroformo / metanol (2/1)(v/v). Evaporados a sequedad los disolventes, se registró su peso.

#### 11.3.7.8. Cuantificación de los diferentes componentes lipídicos caracterizados

##### 11.3.7.8.1. Colesterol y ésteres del colesterol

Estas dos fracciones se cuantificaron conjuntamente procediéndose como sigue:

a) Saponificación de una alícuota de la fracción de lípidos neutros: se realizó por la técnica descrita por Christie (1973). Para ello, una alícuota de la fracción de los lípidos neutros, previamente pesada, se hirvió a reflujo durante 1 hora en un volumen apropiado de una solución de KOH 1 N en etanol del 95%. Posteriormente se enfrió la solución y se le adicionaron 2 volúmenes de agua. Los insaponificables se extrajeron tres veces con 0,5 volúmenes de éter etílico libre de peróxidos. El extracto etéreo se lavó varias veces con agua y finalmente se deshidrató, añadiéndole sulfato sódico anhidro, manteniendo la mezcla en refrigeración toda la noche. Los disolventes se eliminaron posteriormente con ayuda de un rotavapor.

b) Determinación del colesterol: la determinación del colesterol del insaponificable se llevó a cabo con la técnica descrita por Moore y Bauman (1952), utilizando el reactivo de Liebermann-Burchard (anhídrido acético redestilado-ácido sulfúrico del 95,5%)(19/1)(v/v). A la muestra disuelta en 2 ml. de ácido acético se le añadieron 4 ml. del reactivo. Los tubos con la muestra y el reactivo se introdujeron en un baño de agua a

25°C, durante 30 minutos y se leyó su extinción a 620 nm, frente a un blanco de ácido acético. Las lecturas se refirieron a una curva patrón elaborada con colesterol a diferentes concentraciones, en el rango 0,2 - 1,2 mg. ( Fig. II.1 ).

Por otra parte, mediante una cromatografía preparativa en capa fina se separó una cantidad adecuada de colesterol cuyo contenido preciso se determinó también mediante la técnica de Moore y Bauman (1952).

Las diferencias entre los valores del colesterol obtenidos a partir del insaponificable y de la capa fina se atribuyeron al colesterol esterificado. La tasa de ésteres de colesterol se estimó teniendo en cuenta la relación de los pesos moleculares del colesterol oleato y colesterol libre.

#### II.3.7.8.2. Ácidos grasos libres

Se cuantificaron por titulación de alícuotas de muestras purificadas en capa fina.

Después de eliminar los disolventes usados para eluir los ácidos grasos libres de las placas cromatográficas, la muestra se disolvió en un volumen apropiado (aproximadamente 5 ml.) de éter etílico - etanol al 95% (1/1)(v/v) al que se añadió como indicador unas gotas de rojo de cresol al 0,005 %. La titulación se realizó con NaOH 0,005 N en etanol del 70%. Durante la titulación, se burbujeó continuamente nitrógeno a través de la mezcla para agitarla y disminuir el CO<sub>2</sub> atmosférico.

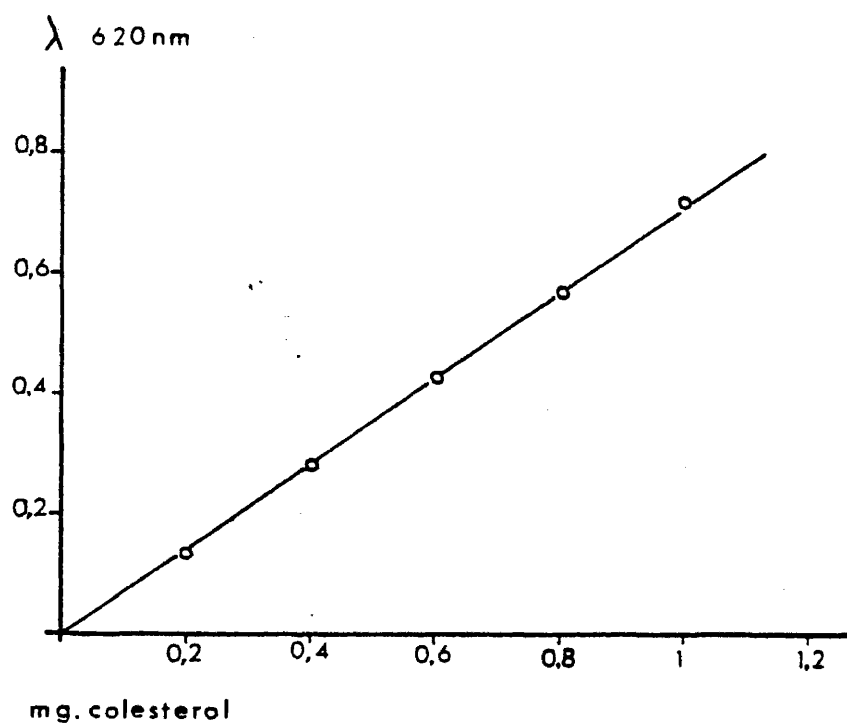


Figura II.1. Gráfica patrón para las determinaciones de colesterol por el método de Moore y Bauman (1952).

El contenido en ácidos grasos libres se calculó utilizando el peso molecular del ácido graso libre promedio deducido a partir de los datos obtenidos por cromatografía en fase gaseosa con la fórmula:

$$\text{p.m. del ácido graso libre promedio} = \frac{100}{\Sigma (\% \text{ en peso/p.m.})}$$

La fórmula utilizada para el cálculo del contenido en ácidos grasos libres fué:

$$\text{ácidos grasos libres (\%)} = \frac{V \times N \times \text{p.m.} \times 100}{P}$$

en donde:

V = ml. de NaOH

N = normalidad del NaOH

p.m. = peso molecular del ácido graso libre promedio

P = peso de la muestra depositada en la placa cromatográfica

#### II.3.7.8.3. Hidrocarburos

Se cuantificaron por pesada. Para ello, de una cromatografía en capa fina se obtuvieron, conjuntamente, las fracciones correspondientes a los hidrocarburos y a los ésteres del colesterol. Después de pesadas, se <sup>les</sup> restó el valor de los ésteres de colesterol (en términos de colesterol oleato) calculado según se indica en II.3.7.8.1.

#### II.3.7.8.4. Fosfolípidos

Se cuantificaron basándose en el contenido en fósforo de alícuotas de muestras purificadas en cromatografía en capa fina.

- Determinación del fósforo: las determinaciones de fósforo, necesarias para la cuantificación de los fosfolípidos, se realizaron siguiendo el método descrito por Chen y Toribara (1956) utilizando los siguientes reactivos:

ácido sulfúrico 6 N

ácido sulfúrico concentrado

ácido perclórico al 60% (v/v)

ácido ascórbico al 10% (p/v)

molibdato amónico al 2,5% (p/v)

Reactivo A, preparado mezclando 1 volumen de ácido sulfúrico 6 N con 2 volúmenes de agua destilada y 1 volumen de molibdato amónico al 2,5% y añadiendo posteriormente 1 volumen de ácido ascórbico. Este reactivo se preparó inmediatamente antes de realizar las determinaciones.

- Técnica: se pipetearon en sendos tubos de ensayo, tres alícuotas de cada muestra, se eliminaron los disolventes por evaporación con nitrógeno. Al extracto se añadieron 0,1 ml. de la siguiente mezcla: 3 partes de ácido sulfúrico concentrado y 2 partes de ácido perclórico calentándose posteriormente a la llama hasta que la digestión fué completa. Se enfriaron los tubos y se completó el volumen hasta 4 ml. con agua destilada.

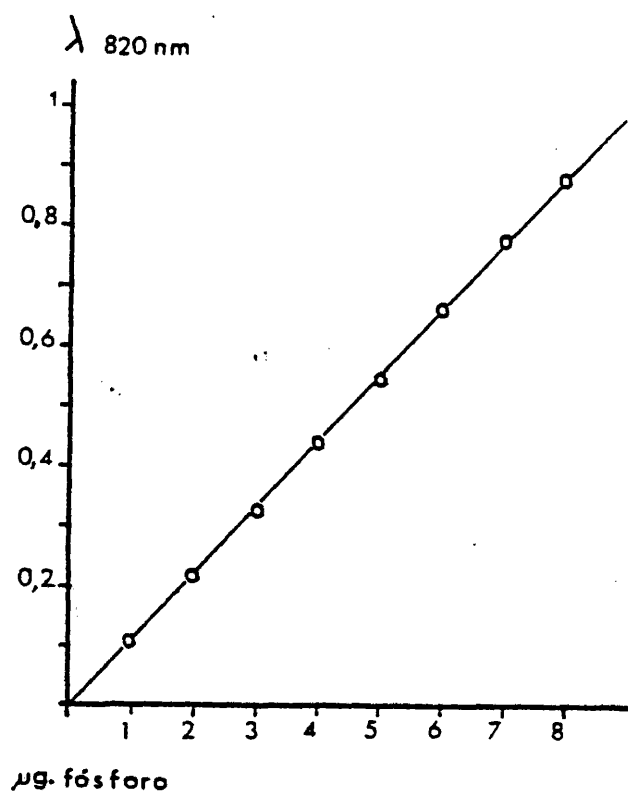


Figura II.2. Gráfica patrón para las determinaciones de fósforo por el método de Chen y Toribara (1956).

Se añadió a cada tubo otro volumen igual del reactivo A; se taparon con parafilm y se introdujeron en un baño de agua a 37°C durante 2 horas; se enfriaron a la temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 820 nm frente a un blanco de agua.

Las lecturas se refirieron a una curva patrón (Fig.II.2) preparada con fosfato monosódico a diferentes concentraciones (entre 1 y 8 µg, de fósforo).

#### II.3.7.8.5. Glicéridos

Existen diferentes métodos de cuantificación de los glicéridos y entre ellos es habitual utilizar el gravimétrico. De hecho muchos autores (Fernández, 1977; López, 1972; Ordoñez, 1974) lo han usado en sus investigaciones. Sin embargo, de acuerdo con Komarek (1964) éste método puede acarrear conclusiones erróneas cuando los diferentes glicéridos se aíslan de cromatogramas en capa fina, debido a pequeñas impurezas procedentes del sílica gel G-60 y del revelador que también puede eluirse de la placa y pesarse. Es probable que el error que se cometa con los triglicéridos sea mínimo, debido a que generalmente constituyen la fracción mayoritaria de los lípidos apolares. En el caso de mono y diglicéridos puede ser muy significativo. Por ello, en las experiencias que se describen en esta tesis se desechó el método gravimétrico al considerarlo poco preciso y se trató de utilizar otro que proporcionara resultados más exactos.

El método elegido está basado en la determinación cuan-



titativa por espectrofotometría infrarroja según las recomendaciones de Freeman y col. (1957) quienes lo han utilizado para analizar los lípidos del suero sanguíneo.

a) Obtención de la muestra: los glicéridos se aislaron por cromatografía preparativa en capa fina, de acuerdo con la metodología descrita en II.3.7.7.

b) Células de espectrofotometría: para las cuantificaciones se utilizaron cubetas de bromuro potásico aunque ocasionalmente, para comprobar la pureza de los triglicéridos aislados, se registró su espectro entre placas de NaCl.

c) Preparación de la célula: con las cubetas utilizadas se procedió a determinar el espesor de capa. Para ello, se hizo un registro, con la cubeta vacía, en la región infrarroja desde  $4000\text{ cm}^{-1}$  hasta  $600\text{ cm}^{-1}$ , obteniéndose las correspondientes ondas de interferencia. Posteriormente se aplicó la fórmula:

$$d = \frac{n}{2 (V_1 - V_2)}$$

en donde, d = camino óptico

n = nº de ciclos completos entre  $V_1$  y  $V_2$

$V_1$  = longitud de onda inicial

$V_2$  = longitud de onda final

en nuestro caso concreto los valores fueron

$$d = \frac{38}{2 (4000 - 600)} = 0,005588\text{ cm.}$$

$$d = 55,88\text{ }\mu\text{m.}$$

d) Disolventes empleados: en el caso de los triglicéridos se utilizó disulfuro de carbono para espectrofotometría (Merck) cuyo espectro se muestra en la Fig. II.3; los mono y diglicéridos no se disuelven bien en el solvente anterior, por lo que se empleó cloroformo igualmente de calidad espectrofotométrica (Fig.II.4)

e) Comprobación de la pureza de los glicéridos aislados por cromatografía de capa fina: con el fin de comprobar la inexistencia de contaminaciones que pudieran interferir con los análisis primero se observó la pureza de los glicéridos aislados. Para ello se registraron los espectros de los mono y diglicéridos disueltos en cloroformo y el de los triglicéridos, dado que se disponía de más cantidad, entre placas de cloruro sódico. Sus respectivos registros se confrontaron con patrones Sigma. Estos espectros fueron: trioleína con una pureza del 99%; dipalmitina (mezcla de isómeros 1,2- y 1,3-) de igual pureza que el triglicérido y monoestearina (mezcla con un 90% de isómero 1- y un 9% del isómero 2- ).

f) Metodología de la cuantificación: este método está basado en que la función carbonilo esterificada ofrece una banda aguda y aislada entre  $1700$  y  $1800\text{ cm}^{-1}$ . En las Fig. II.5., II.6., y II.7. se muestran los espectros de los patrones de trioleína, dipalmitina y monoestearina respectivamente. Aunque el enlace éster ofrece otra banda entre  $1130$  y  $1200\text{ cm}^{-1}$ , con un máximo en aproximadamente  $1160\text{ cm}^{-1}$ , es menos delimitada y por tanto no tan adecuada para este tipo de determinaciones.

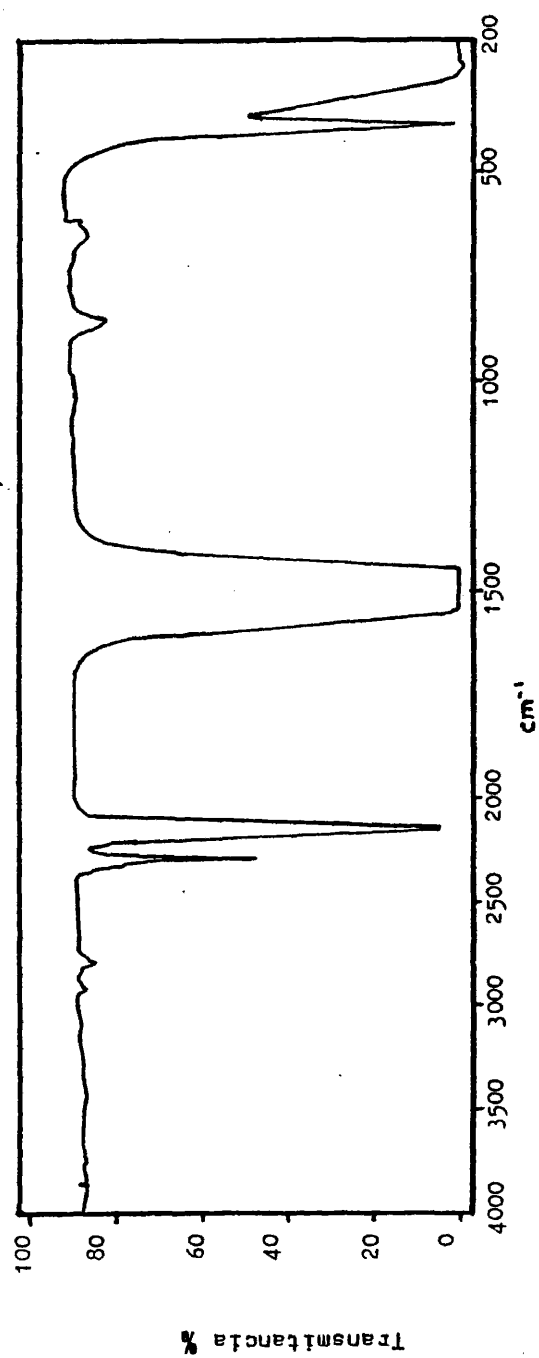
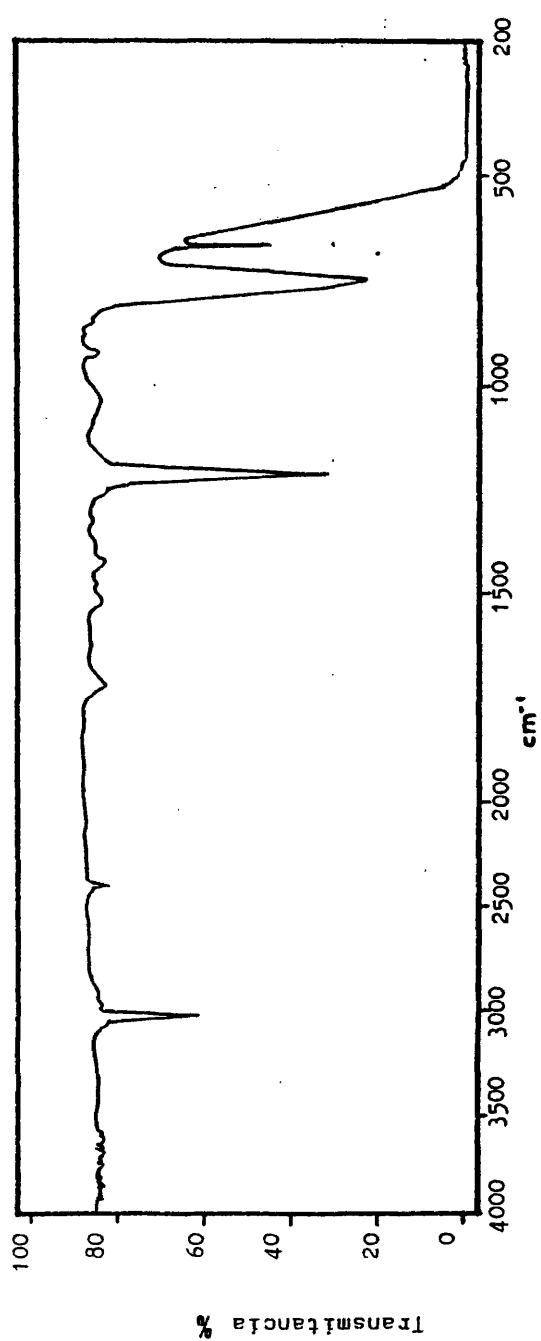


Figura II.3. Espectro infrarrojo de disulfuro de carbono en cubeta de KBr.



103

Figura II.4. Espectro infrarrojo de cloroformo entre placas de NaCl.

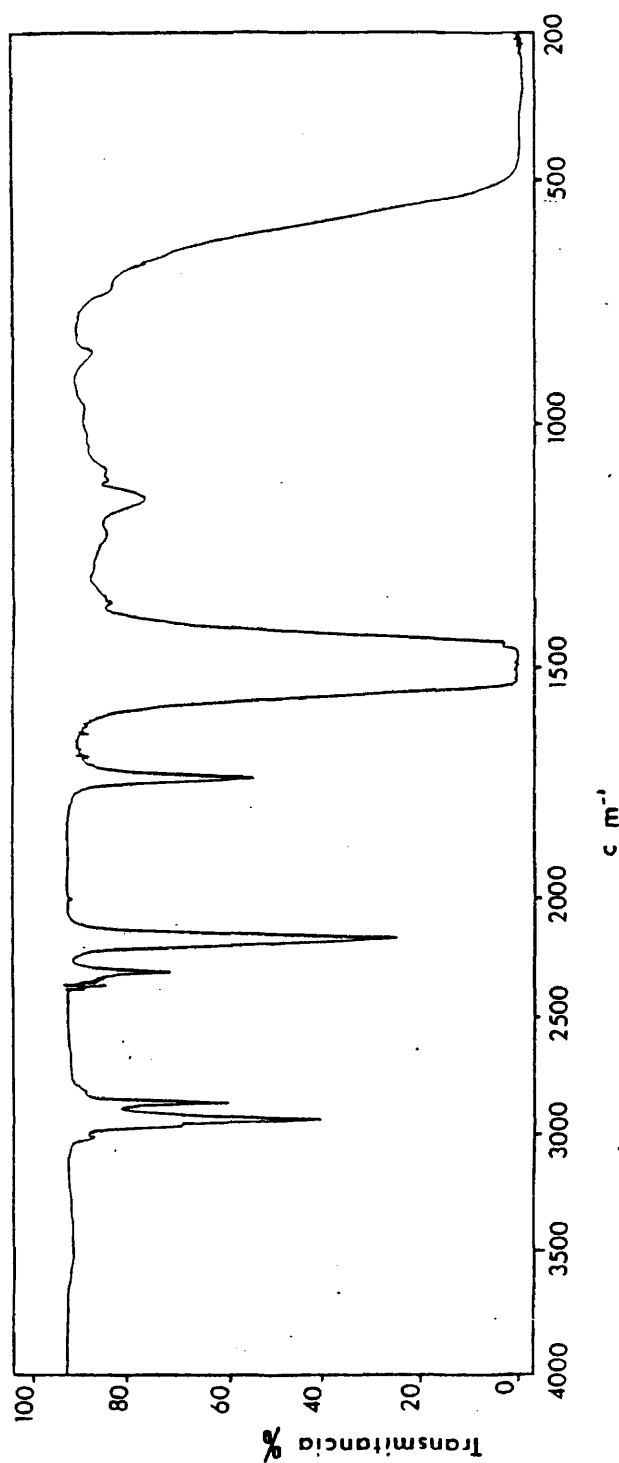
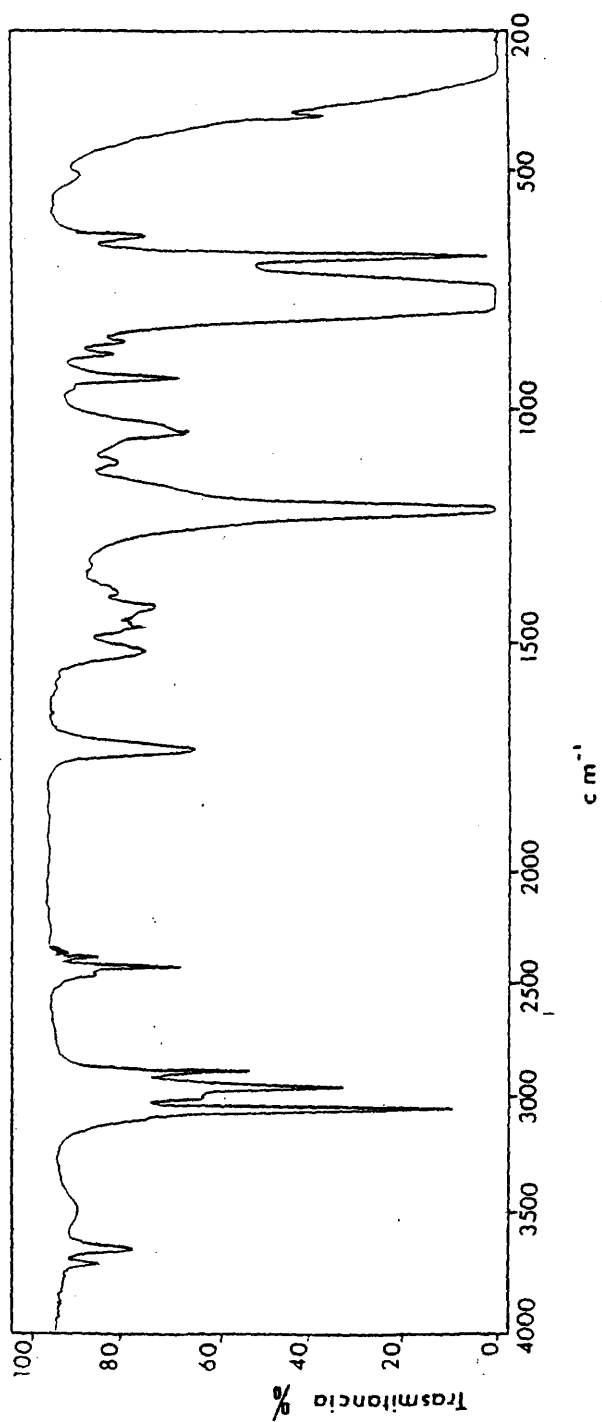


Figura II.5. Espectro infrarrojo (en disulfuro de carbono) de un patrón de trioleína (sigma).



105

Figura II.6. Espectro infrarrojo (en cloroformo) de un patrón de dipalmitina (Sigma).

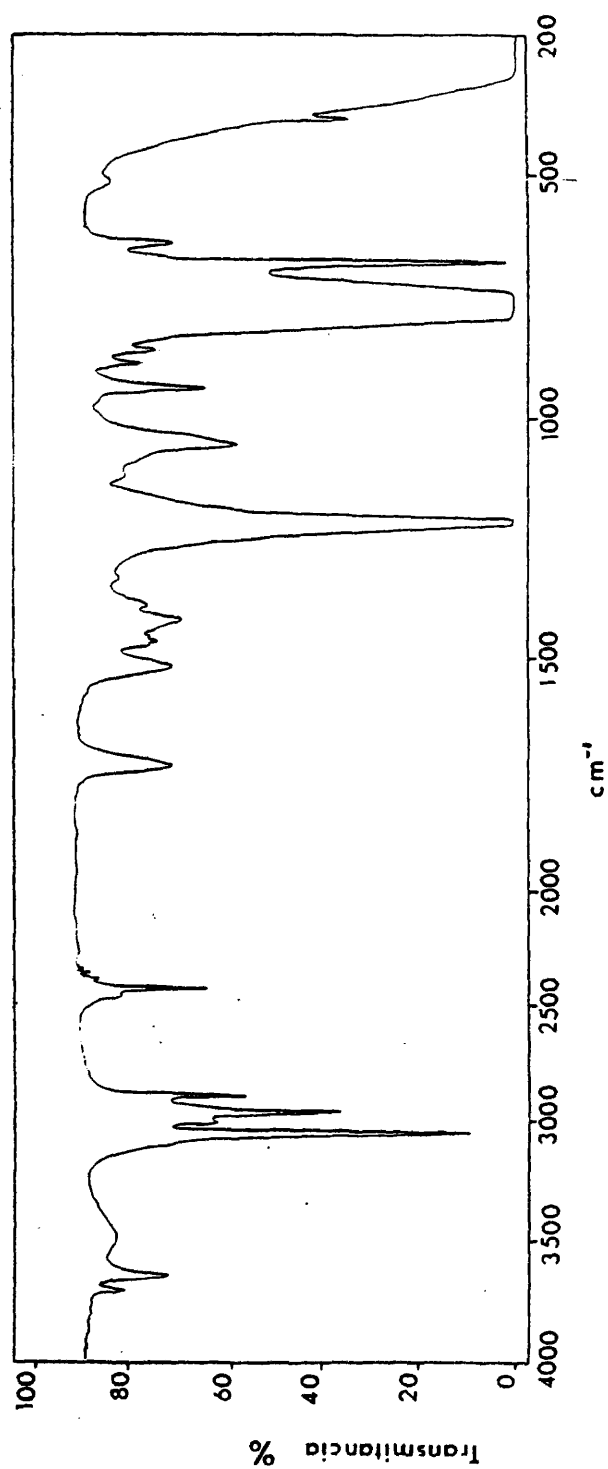


Figura II.7. Espectro infrarrojo (en cloroformo) de un patrón de monoestearina (Sigma).

Basándonos en la absorbancia máxima de la banda aguda entre  $1700$  y  $1800\text{ cm}^{-1}$  se prepararon curvas patrones con diferentes concentraciones de glicéridos patrones (trioleína, dipalmitina y monoestearina).

f.1.- Preparación de las curvas patrón:

Triglicéridos: se pesó una cantidad conocida de trioleína y se disolvió en un volumen adecuado de di sulfuro de carbono. A partir de esta solución madre se tomaron partes alícuotas con el fin de obtener distintas concentraciones del triglicérido. Con dichas alícuotas y con ayuda de una jeringa adaptable al dispositivo que lleva incorporado la cámu la, se llenó la cubeta teniendo siempre la precaución de evitar la presencia de burbujas de aire. Se registró la banda del en-lace éster en absorbancias. Tras cada determinación, se puso especial cuidado en la limpieza de las cubetas lo que se realizó pasando por ellas un volumen suficiente del mismo disolvente (aproximadamente  $5\text{ ml.}$ ), secándola<sup>s</sup> posteriormente mediante la aplicación conjunta de vacío y aire caliente para evitar conden saciones de agua debidas al frío provocado por la evaporación del disolvente. La Fig. II.8. recoge las bandas de absorbancia patrones a diferentes concentraciones y la Fig. II.9. la gráfica patrón construida con los datos deducidos de la Fig. II.8.

Mono y diglicéridos: se procedió de forma similar a la descrita para los triglicéridos en los siguientes puntos:



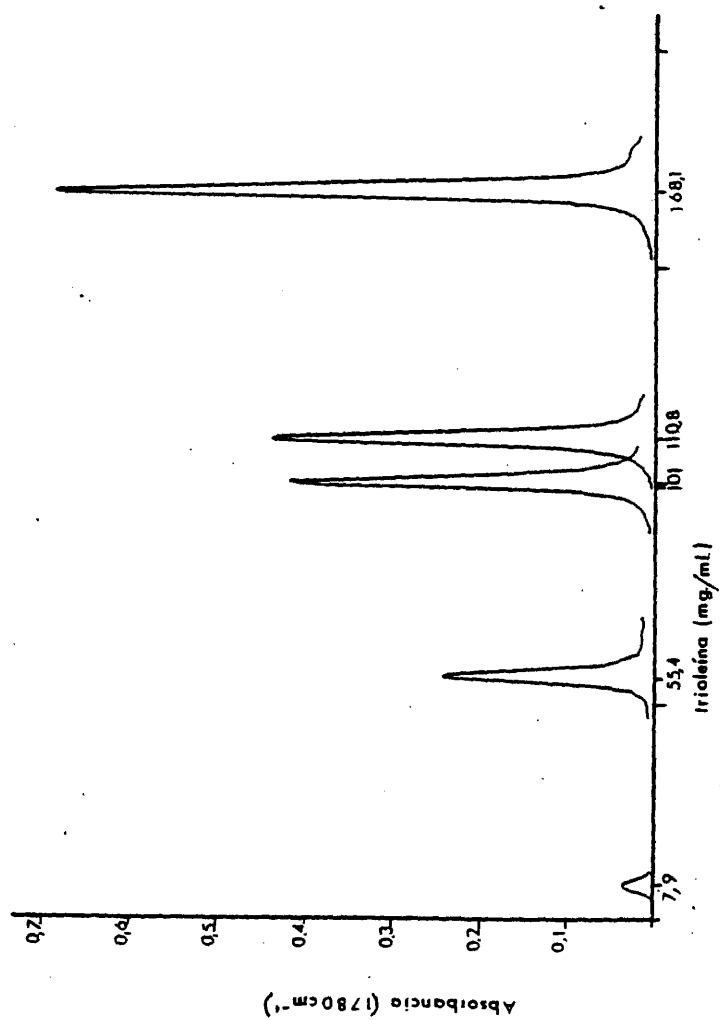


Figura II.8. Picos de absorbancia a  $1780\text{ cm}^{-1}$  de la función carbonilo esterificada de diferentes concentraciones de trioleína (Sigma) disuelta en  $\text{CCl}_2$ .

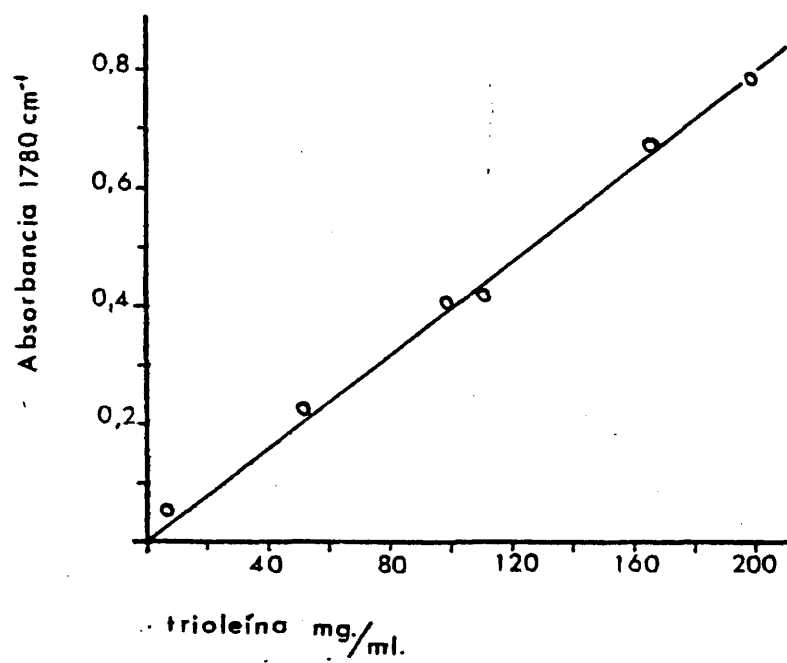


Figura II.9. Gráfica patrón para las determinaciones de triglicéridos ( disueltos en C<sub>32</sub> ) por espectrofotometría I.R.

- el disolvente utilizado fué cloroformo
- debido a la escasa cantidad de muestra recogida de la cromatografía en capa fina, con el fin de obtener unos picos de absorbancia adecuados, fué necesario utilizar la expansión de escala del aparato (x5), el tiempo de recorrido fué x16 el tiempo normal que, con el espectrofotómetro utilizado, es de 10 minutos aproximadamente para la totalidad del espectro (4000 a  $200\text{ cm}^{-1}$ ), disminuyendo el ruido de fondo a 1/4 del normal. Las fig. II.10 y II.11 muestran las gráficas patrones obtenidas con la dipalmitina y la monoestearina.

#### II.3.7.9. Formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres

Los ácidos grasos libres se metilaron con diazometano, por el procedimiento descrito por Schlenk y Gallerman (1960), para lo cual se usaron los siguientes reactivos:

- reactivo M.N.S.A., preparado disolviendo 2 milimoles de n-metil-n-nitroso-paratoluensulfonamida por miliequivalente de ácido graso a metilar, en 1 ml. de éter etílico libre de peróxidos.

- solución de 2-(2-etoxi-etoxi)etanol (carbitol), preparada mezclando 0,7 ml. de carbitol con 0,7 ml. de éter etílico y 1 ml. de KOH al 60%.

- éter etílico libre de peróxidos

- éter etílico - metanol (9/1)(v/v)

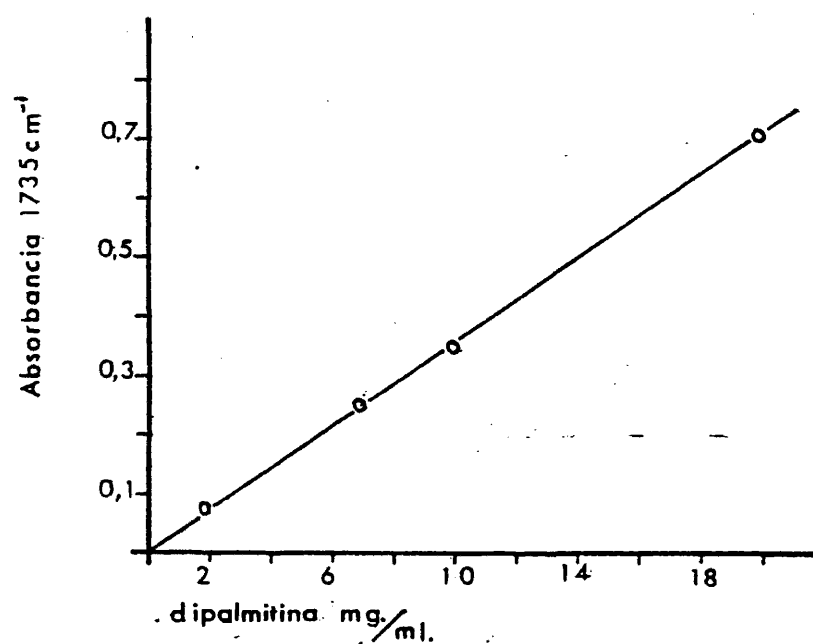


Figura II.10. Gráfica patrón para las determinaciones de diglicéridos ( disueltos en  $\text{Cl}_3\text{CH}$ ) por espectrofotometría I.R.



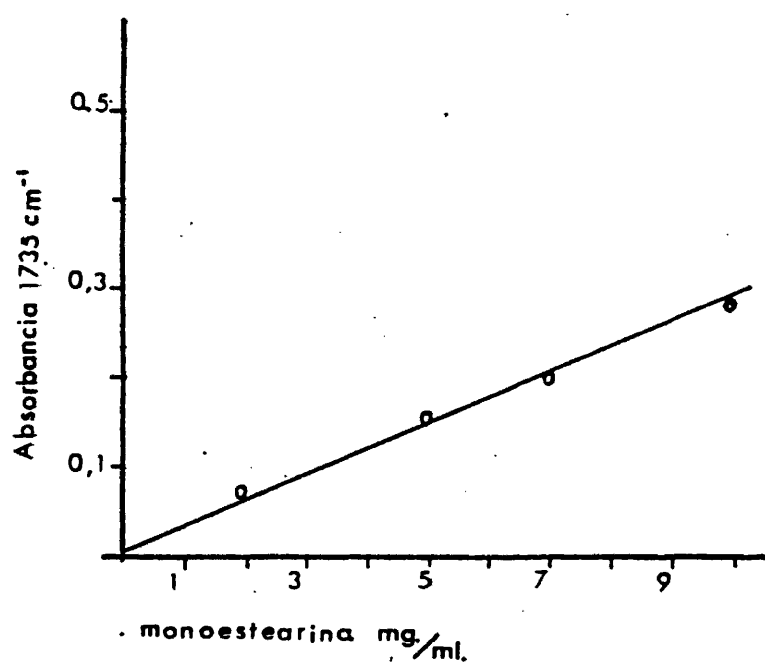


Figura II.11. Gráfica patrón para las determinaciones de monoglicéridos (disueltos en  $\text{Cl}_3\text{CH}$ ) por espectrofotometría I.R.

Una vez distribuidos los reactivos en los tubos del dispositivo de Schlenk y Gallerman, modificado por Zugaza, (Fig. II.12), se hizo pasar por el sistema una corriente de nitrógeno a un flujo de 6 ml./min.. Luego el reactivo de M.N.S.A. se puso en contacto con el reactivo del carbitol, desprendiéndose diazometano, que es arrastrado por la corriente de nitrógeno y satura el éter. Una vez saturado el éter con diazometano se hace circular éste por un tubo de triple acodadura (Fig.II.12), sumergido en un recipiente que contenía una mezcla de hielo y agua, haciéndolo burbujear finalmente en el tubo que contenía la muestra de los ácidos grasos a metilar, disuelta en 3 ml. de éter etílico (9/1)(v/v).

Al cabo de unos minutos la muestra a metilar adquiere un tono amarillento, debido al exceso de diazometano, lo que indica que el proceso de metilación ha terminado y que la muestra se halla dispuesta para ser inyectada en el cromatógrafo.

#### II.3.7.10. Transesterificación y formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los glicéridos y fosfolípidos

Para la formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los glicéridos y fosfolípidos, se utilizó el método de transesterificación de Sheata y col. (1970), utilizando los siguientes reactivos:

- a) Reactivo transesterificador: se obtuvo mezclan

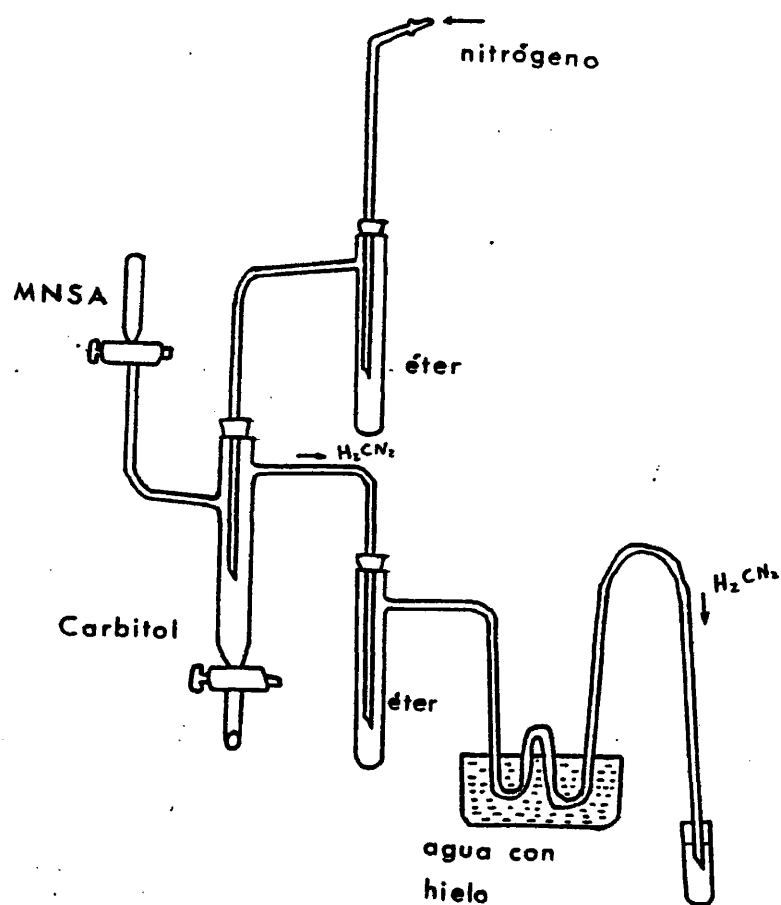


Figura II.12. Modificación de Zugazadel dispositivo empleado por Schlenk y Gallerman (1960) para la formación de los ésteres metálicos de ácidos grasos libres.

do 1,5 ml. de metilato sódico 0,5 N (preparado disolviendo 0,0575g de sodio en 5 ml. de metanol), con 6 ml. de éter de petróleo y con 2,5 ml. de éter etílico libre de peróxidos. Este reactivo forma una sola fase a la temperatura ambiente. Debido a su elevada volatilidad, se preparó en pequeñas cantidades y se mantuvo en tubos con tapón de teflón en un desecador a 2 - 4°C.

b) Eter de petróleo (40°-60°) y éter etílico libre de peróxidos: para efectuar la transesterificación se tomó alrededor de 1 mg. de la muestra y se disolvió en 2 ml. de éter de petróleo, depositándolo en un tubo de 30 x 3 mm. El disolvente se evaporó bajo corriente de nitrógeno.

Con una microjeringa, se añadieron 25 µl. de éter de petróleo. Se tapó de nuevo el tubo, se agitó suavemente y se mantuvo a la temperatura ambiente durante dos minutos, al cabo de los cuales se procedió a la inyección en el cromatógrafo.

#### II.3.7.11. Cromatografía de los ésteres metílicos de los ácidos grasos

Se emplearon columnas de vidrio rellenas de dietilen - glicol - succinato sobre Chromosorb W suministradas por Teknokroma, S.C.

Las condiciones de las cromatografías fueron las siguientes: Gas portador (nitrógeno) a un flujo de 40 ml./min.; flujo de aire: 300 ml./min.; velocidad de la carta: 10 mm./min.; bloque de inyección a 215°C y detector de llama a 210°C.



#### II.3.7.12. Identificación de los ácidos grasos

La identificación se llevó a cabo basándose en los tiempos de retención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos analizados y su comparación con los tiempos de retención de los ésteres metílicos patrón (Sigma), cromatografiados en las mismas condiciones.

#### II.3.7.13. Cálculo de los porcentajes de los ácidos grasos identificados

La determinación cuantitativa se efectuó basándose en el principio de que los pesos de cada uno de los componentes separados de la mezcla, son proporcionales a las áreas comprendidas dentro de los picos correspondientes del registro gráfico. Cuando se trabajó con atenuaciones diferentes se multiplicó el área de los picos por el factor de atenuación correspondiente.

#### II.3.7.14. Estimación del índice de Iodo

El índice de Iodo, como se sabe, se define como los gramos de Iodo que pueden ser fijados por 100 g. de grasa.

Se estimó de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$I_{lc} = I_{le} \times \% e \quad \text{siendo}$$

$I_{lc}$  = Índice de Iodo calculado

$I_{le}$  = Índice de Iodo específico de cada ácido graso insaturado

$\% e$  = Porcentaje en peso, del ácido graso específico obtenido a partir de los cromatogramas.

### II.3.8. Análisis sensorial

#### II.3.8.1. Jurado de catadores

Se utilizó un jurado compuesto de 16 catadores, seleccionados entre el personal del Departamento. A los miembros del jurado se les explicó, previamente, de forma detallada el objetivo del trabajo descrito en esta tesis y las características de las pruebas que se iban a realizar.

#### II.3.8.2. Preparación de la muestra

Al final de la experiencia (100 días) se tomó un número suficiente de truchas y se prepararon lotes de unos 20 g. compuestos de tejido muscular y piel. Dichas muestras, sin condimento alguno, se colocaron en placas de Petri de vidrio y se sometieron a un tratamiento térmico en un horno microondas durante el tiempo necesario para lograr su cocción. Este tiempo se ensayó previamente y resultó ser de 25 segundos.

#### II.3.8.3. Pruebas organolépticas

##### II.3.8.3.1. Prueba triangular

Entre las diversas pruebas de diferenciación que se pueden utilizar para realizar un análisis de esta naturaleza se eligió la prueba triangular. Se realizó de acuerdo con la norma TC 34/SC 12 de la I.S.O. (International Standards Organization).

Se prepararon las muestras de la forma indicada en II.  
3.8.2. y a cada catador se le entregó una combinación de las  
6 posibles:

ABB	BAA
AAB	BBA
ABA	BAB

Se les informó que dos de ellas eran iguales teniendo  
que identificar la distinta. La probabilidad de elegir la dis-  
tinta, al azar, es  $1/3$ .

La temperatura en las tres muestras fué siempre idéntica  
dado que se calentaron simultáneamente en el horno de microondas.

Las respuestas se interpretaron de acuerdo con las tablas  
especificadas por la norma I.S.O.

La prueba triangular se hizo con los dos lotes de truchas  
alimentadas con la dieta experimental y se comparó con el lote  
Control.

#### II.3.8.3.2. Pruebas de preferencia

Una vez cocinadas las truchas (fritura con aceite de oli-  
va y sal) se dieron al mismo jurado de catadores y se califica-  
ron, por separado, el sabor y la textura con arreglo a una escala  
ideada para tal fin (Fig. II.13).

Se les indicó a los miembros del jurado que expresaran  
en la gráfica su parecer sobre las muestras evaluadas. Los jui-  
cios emitidos se midieron en la escala de 10 cm. correspondien-

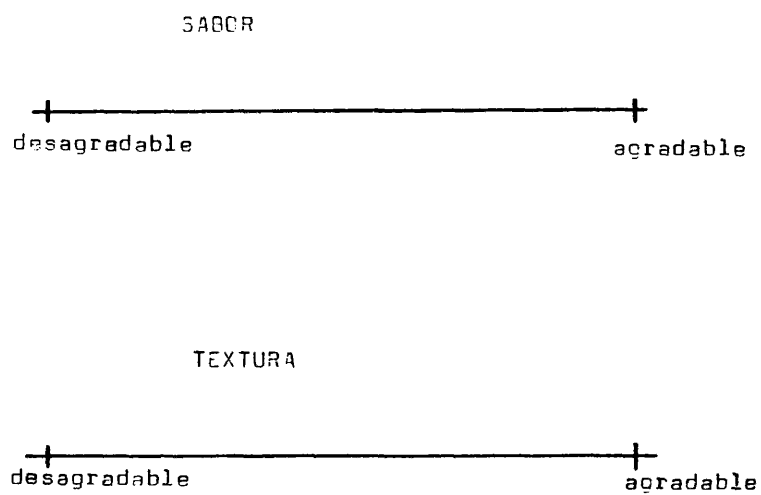


Figura II.13. Escala utilizada para evaluar el sabor  
y la textura de las truchas cocinadas.

do el 0 a desagradable y el 10 a la percepción agradable.

Posteriormente se calculó la media de las puntuaciones obtenidas.

### III RESULTADOS

Es bien sabido que los peces en su ambiente natural sufren profundas oscilaciones en la composición lipídica tanto del músculo como de otros órganos (especialmente el hígado) dependiendo de diversos factores, entre los que se encuentran alimentación, edad, época del año, sexo, actividad o reposo sexual, etc. Tales oscilaciones recaen principalmente en los glicéridos en general, pero a veces también ocurren profundas modificaciones del contenido en fosfolípidos, tal es el caso de Clupea sprattus (Viviani y col., 1968).

Sin restar importancia a la influencia que ciertos factores controlables (oxigenación, velocidad del agua en los estanques, composición del agua, etc.) tienen en el desarrollo de la trucha y composición lipídica del músculo son, sin duda, la dista y la temperatura del agua los agentes que van a influir de una forma más decisiva en las características de los animales así como en la composición lipídica del músculo de los peces que se crían en cautividad con fines industriales.

Por ello, para realizar un estudio como el que se describe en esta tesis resulta imprescindible conocer primero la composición química de los piensos y, de forma particular, la de los lípidos que componen la materia grasa. Por otra parte, también es necesario conocer las fluctuaciones de temperatura a que se ve sometida el agua de los estanques a lo largo de las experiencias.

### III.1. Composición química de los piensos

Procediendo según se describe en el apartado II.3.1. se prepararon dos piensos distintos, uno incorporando al Control torta de orujo de aceituna y otro adicionándole grasa técnica de matadero. Una vez preparados se analizó la composición química de cada uno, al igual que la del pienso Control. La Tabla III.1 refleja los resultados.

Las diferencias tan notables del contenido de agua del pienso control y de los experimentales se deben a que el primero es un pienso de fabricación industrial y ajustado, por tanto, a la tecnología empleada por la fábrica mientras que los experimentales han sido preparados en el laboratorio, hidratándolos antes de la adición de orujo de aceituna o de la grasa técnica de matadero y desecándolos después por liofilización. Estas diferencias no van a tener influencia alguna en la alimentación de los animales ya que al arrojar los gránulos al agua de los estanques se hidratan rápidamente.

Evidentemente, los piensos experimentales contienen un mayor porcentaje de grasa reflejo de los ingredientes adicionados. Estas diferencias en los porcentajes son menores en el caso del pienso OR debido a la composición del orujo de aceituna cuyos componentes mayoritarios fueron: humedad 26,95% y grasa 10,5%.

Por lo demás, se observa una reducción del contenido

TABLA III.1

Composición química de los piensos

Pienso	Extracto seco	Grasa		Proteína		Fibra Bruta		Cenizas		E.L.N.▼		Energía (KJ)	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Control	89,55	7,49	8,37	43,64	48,74	4,61	5,50	11,25	12,57	22,56	24,82	1379,9	1535,4
Exp. OR	96,89	9,29	9,59	42,88	44,26	5,30	5,47	13,78	14,20	25,64	26,48	1482,9	1530,9
Exp. GT	97,15	18,49	19,04	41,48	42,70	3,48	3,59	10,98	11,31	22,72	23,36	1752,8	1808,4

1. g/100 g pienso

2. g/100 g extracto seco

▼E. L. N.: Extractivos Libres de Nitrógeno

Control: pienso comercial

Exp. OR: pienso comercial adicionado con un 11 % de orujo de aceituna

Exp. GT: pienso comercial adicionado con un 11 % de grasa técnica de matadero.



proteico concomitante con el incremento de los componentes de los ingredientes añadidos.

### III.2. Temperatura del agua de los estanques durante el periodo de experimentación

La temperatura del agua se midió dos veces al día, a primera hora de la mañana y al atardecer. En términos generales, las diferencias entre ambos registros fué de unos 2-3°C. En la Figura III.1 se muestra la evolución de la temperatura media a lo largo de las experiencias.

### III.3. Variación en el peso y talla de las truchas sometidas a las distintas raciones experimentales

La evolución de los pesos y tamaños de los diferentes lotes de truchas con indicación del tipo de alimentación recibida y del tiempo que fueron sometidas a esa alimentación se recogen en la Tabla III.2 y en la Figura III.2 y III.3 .

En términos generales, se observa que los animales de los tres lotes triplicaron el peso durante los 100 días que duró la experiencia.

### III.4. Evolución de la composición química de los diferentes lotes de truchas

A los días previstos (45, 70 y 100) se recogió un nú-

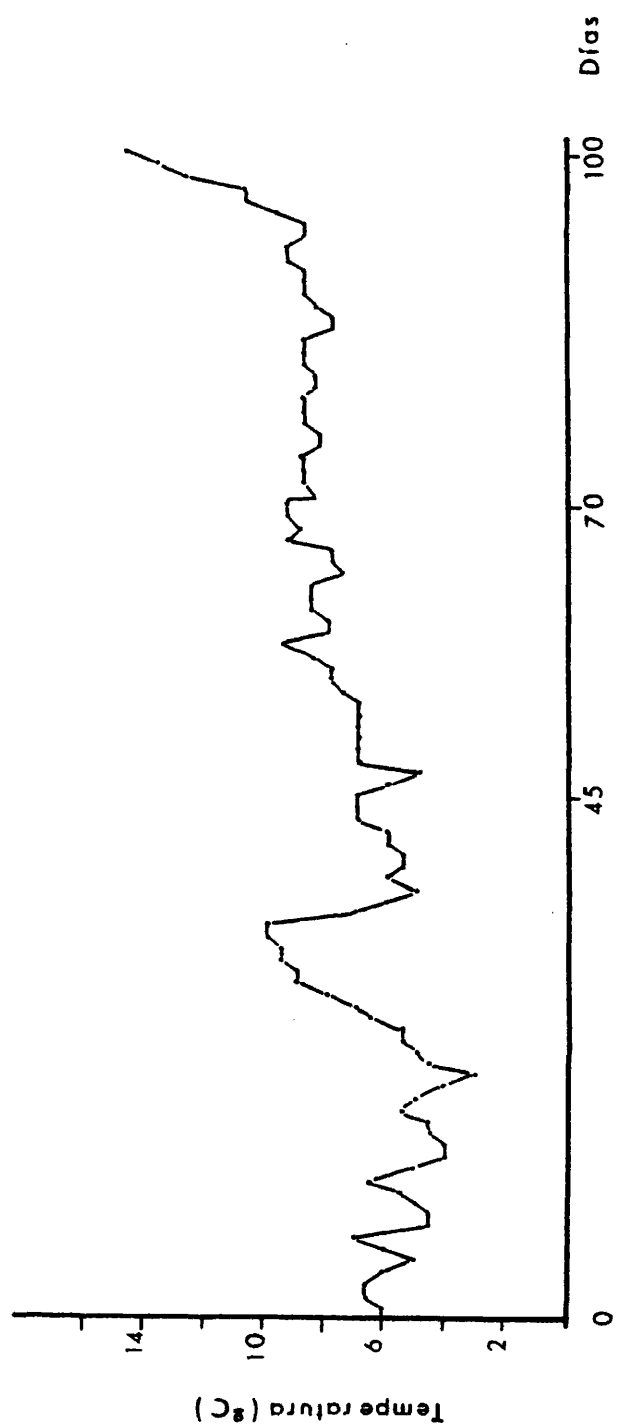


Figura III.1. Evolución de la temperatura del agua de los estanques durante las experiencias.

TABLA III.2

Peso y tamaño medios ( $\pm$  desviación standard) de las truchas sometidas a las distintas raciones experimentales.

Días sometidas a la ración experimental	Tipo de pienso	Lotes	Ejemplares analizados de cada lote	Peso medio ( g )	Longitud media ( cm )
0	Comercial	Inicial	60	28,60 $\pm$ 12,27	12,83 $\pm$ 1,74
45	Control	C-45	48	45,36 $\pm$ 15,20	15,38 $\pm$ 1,90
45	Exp. OR	OR-45	58	47,07 $\pm$ 16,14	15,70 $\pm$ 1,58
45	Exp. GT	GT-45	56	48,70 $\pm$ 14,44	16,46 $\pm$ 1,60
70	Control	C-70	50	65,26 $\pm$ 18,02	17,43 $\pm$ 1,69
70	Exp. OR	OR-70	52	70,65 $\pm$ 24,31	17,47 $\pm$ 2,10
70	Exp. GT	GT-70	57	64,00 $\pm$ 19,30	17,37 $\pm$ 1,73
100	Control	C-100	64	92,50 $\pm$ 23,72	19,32 $\pm$ 1,67
100	Exp. OR	OR-100	76	76,34 $\pm$ 21,84	18,15 $\pm$ 1,68
100	Exp. GT	GT-100	70	79,38 $\pm$ 20,74	18,53 $\pm$ 1,73

Control: pienso comercial

Exp. OR: pienso comercial adicionado de un 11% de orujo de aceituna

Exp. GT: pienso comercial adicionado de un 11% de grasa técnica de matadero.

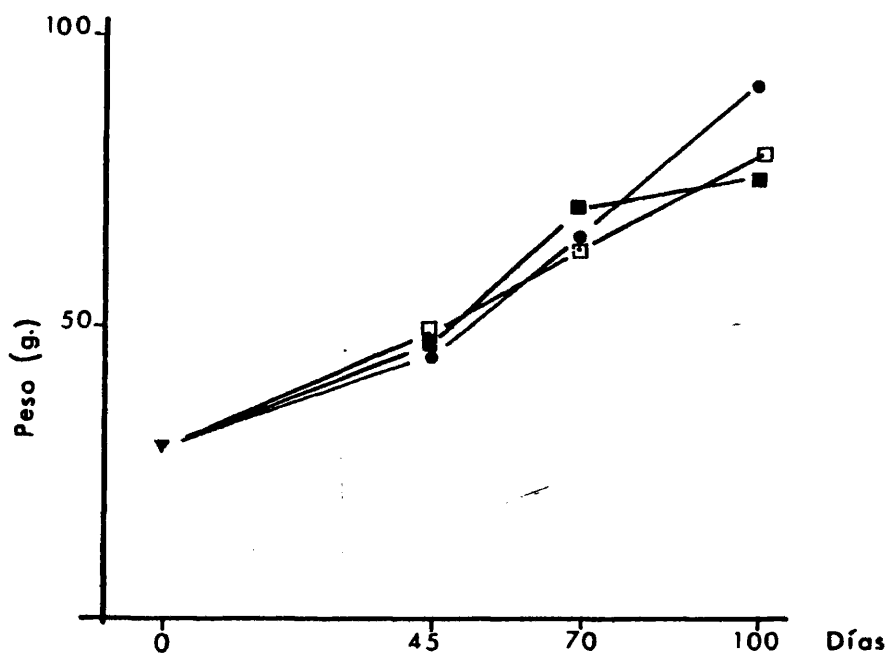


Figura III.2. Evolución del peso de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado.

- ▼ Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales .
- Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial
- Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna
- Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

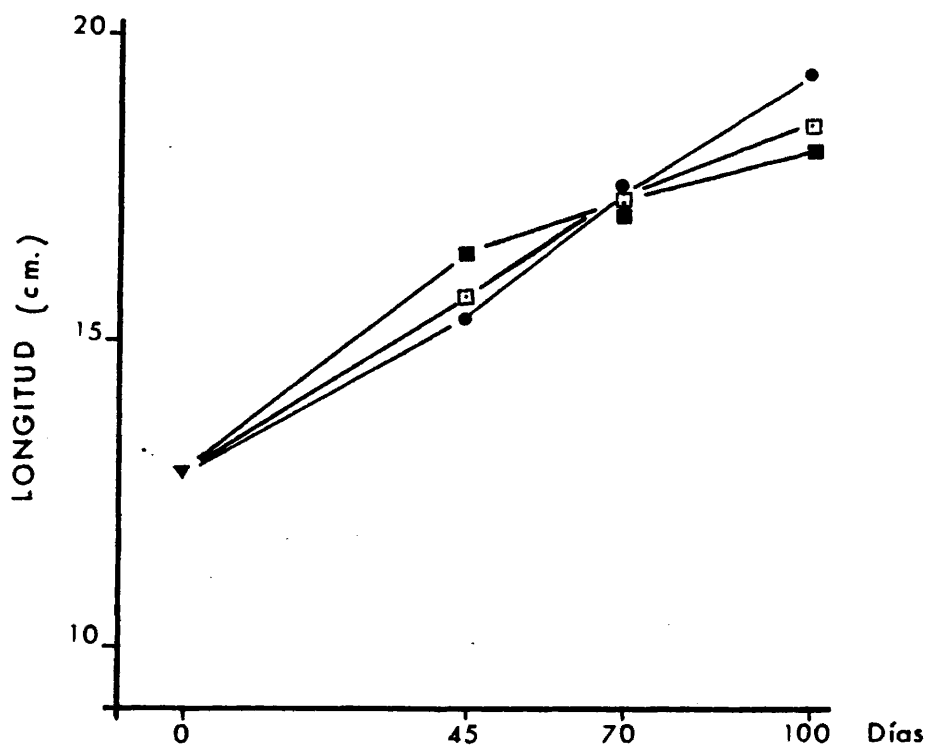


Figura III.3. Evolución de la talla de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado.

▼ Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

● Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■ Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□ Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

mero suficiente de animales y se transportaron al laboratorio. Obtenida la musculatura de cada animal, se mezclaron las de cada lote (véase II.3.4) y en la mezcla se determinó, por triplicado, el contenido de humedad, proteína y grasa. La Tabla III.3 recoge los resultados expresados en g/100 g de muestra y g/100 g de extracto seco. Las Figuras III.4, III.5 y III.6 muestran, respectivamente, la evolución de la humedad, proteína y grasa (g/100g de muestra) y las Figuras III.7 y III.8 la evolución de la proteína y grasa en g/100g de extracto seco.

De las Tablas y Figuras anteriormente citadas se deduce, de una forma clara, la inexistencia de diferencias significativas entre los lotes de truchas.

TABLA III.3

Composición química de las truchas

Lotes	Humedad	Grasa		Proteína		Total*
		1	2	1	2	
Inicial	79,93	2,37	11,81	17,36	85,50	99,66
C-45	78,63	2,21	10,34	18,28	85,54	99,12
OR-45	78,89	2,27	10,75	18,16	86,03	99,32
GT-45	78,65	2,93	13,72	17,58	82,34	99,16
C-70	78,30	2,33	10,74	19,10	88,02	99,73
OR-70	78,12	2,64	12,06	19,08	87,20	99,84
GT-70	77,51	3,07	13,65	18,95	84,26	99,53
C-100	78,12	2,72	12,43	18,90	86,38	99,74
OR-100	78,21	2,42	11,11	19,33	88,71	99,96
GT-100	77,08	2,91	12,70	19,32	84,29	99,31

1.- g/100g muestra      2. g/100 g extracto seco  
 \*Total: suma de humedad, grasa y proteína en g/100 g de muestra

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales  
 C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado  
 con orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.  
 45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

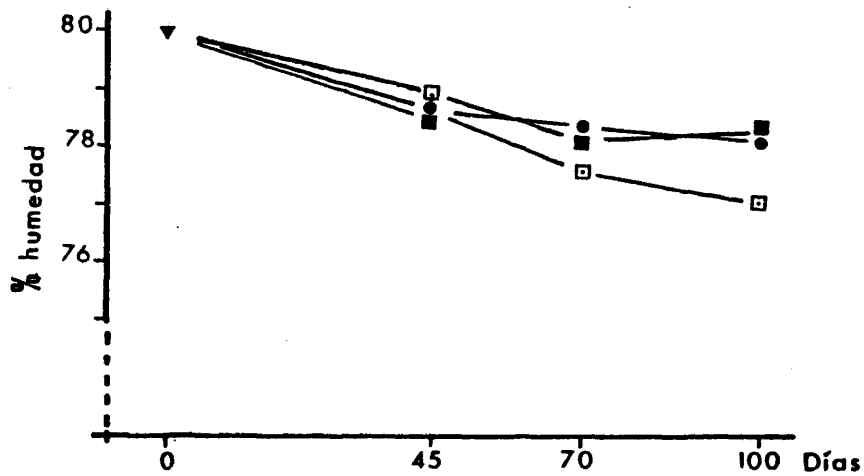


Figura III.4. Variación del contenido de humedad (g/100g músculo) de la musculatura de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado

▼ Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

● Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■ Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□ Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.



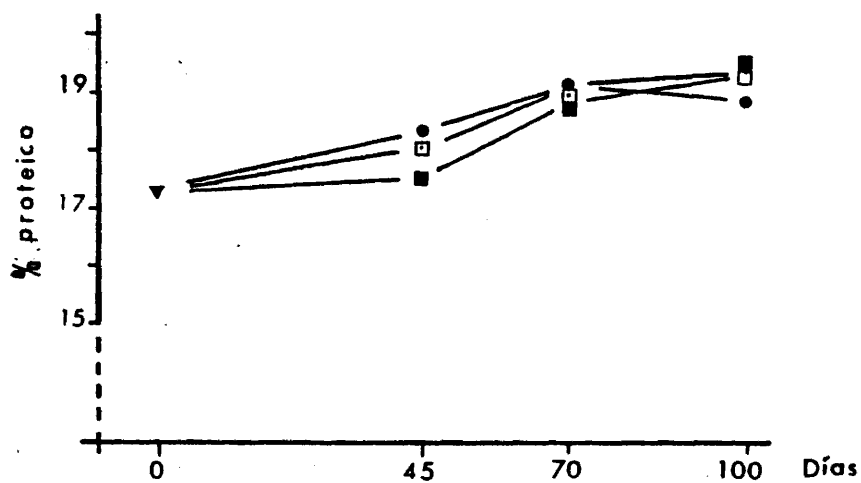


Figura III.5. Variación del contenido proteico (g/100g músculo) de la musculatura de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado

▼ Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

● Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■ Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□ Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

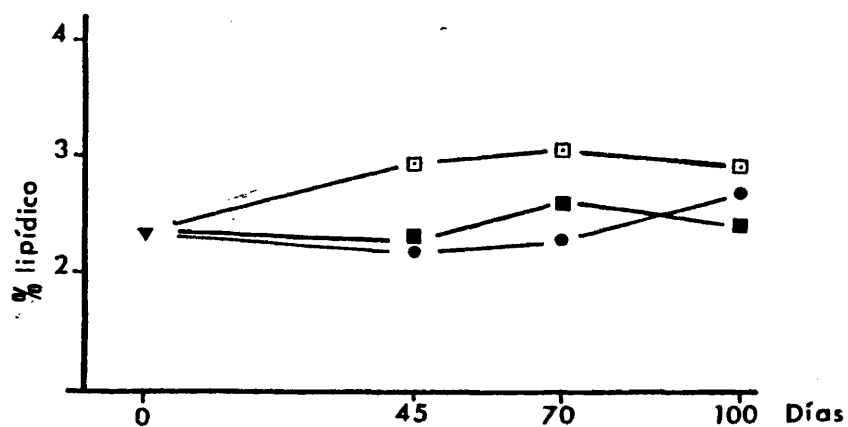


Figura III.6. Variación del contenido lipídico (g/100g músculo) de la musculatura de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado

- ▼ Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales
- Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial
- Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna
- Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

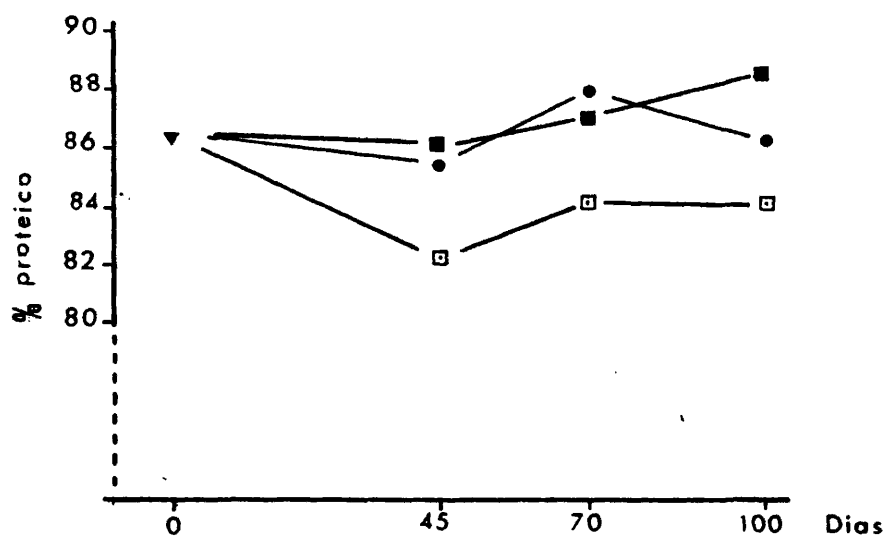


Figura III.7. Variación del contenido proteico del extracto seco (g/100g) de la musculatura de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado.

▼Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

●Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

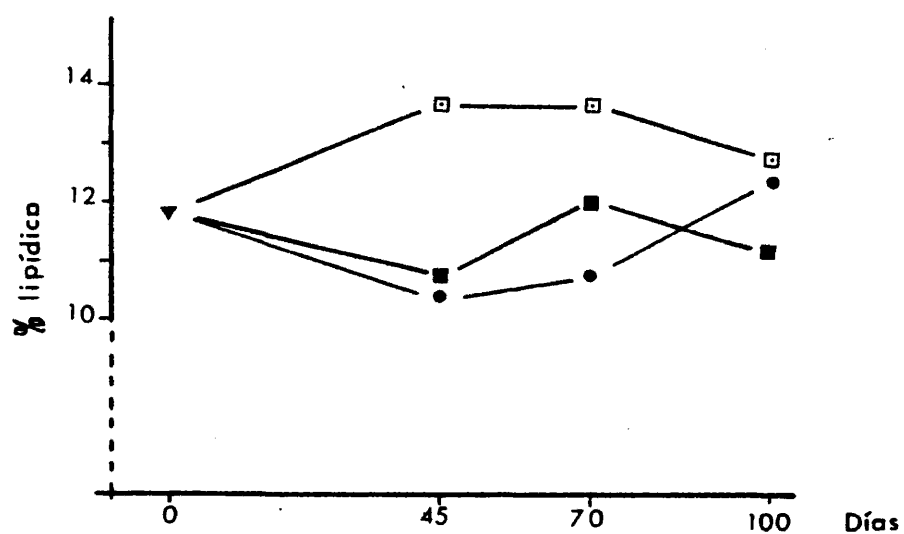


Figura III.8. Variación del contenido lipídico del extracto seco (g/100g) de la musculatura de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado.

▼ Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

● Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■ Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□ Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

### III.5. Composición lipídica de los piensos

#### III.5.1. Extracción del material lipídico

Procediendo según se indica en II.3.6.3. se extrajo la materia grasa de los piensos que sirvió también para determinar su contenido en grasa. Los resultados han quedado recogidos en la Tabla III.1.

#### III.5.2. Fraccionamiento del material lipídico en columnas de ácido silícico/celita (1/1)(p/p).

Con el fin de separar las fracciones apolar y polar de los lípidos del pienso se realizaron cromatografías en columna de ácido silícico/celita (1/1)(p/p) por el método de McLeod y col. (1962) utilizando como eluyentes la secuencia de disolventes descrita por Vorbeck y Marinetti (1965) (véase II.3.7.2).

Las cromatografías en columnas de ácido silícico/celita (1/1)(p/p) permitieron la cuantificación, por pesada, de lípidos neutros, fosfolípidos y productos eluidos con acetona.

La Tabla III.4 recoge los resultados de las cromatografías en columna de ácido silícico/celita (1/1)(p/p) de los tres diferentes lotes de piensos. En todos los casos, el componente mayoritario correspondió a la fracción lípidos apolares, eluidos con cloroformo, con valores que representan el 78,85%; el 83,95% y el 83,71% del total de los lípidos extraídos de la grasa procedente del pienso Control, Experimental OR y Expe-

TABLA III.4

Resultados de las cromatografías en columna de ácido silícico/oelita  
(1/1) (p/p) de los extractos lipídicos de los piensos

	Pienso					
	Control		Exp. OR		Exp. GT	
	<u>mg</u>	<u>%</u>	<u>mg</u>	<u>%</u>	<u>mg</u>	<u>%</u>
Muestra cromatografiada	789,2	100	857,0	100	840,7	100
Fracción eluida con cloroformo	579,2	78,85	666,7	83,95	624,6	83,71
Fracción eluida con acetona	63,0	8,57	49,2	6,19	58,1	7,78
Fracción eluida con metanol	92,3	12,56	78,2	9,84	63,4	8,49
Total recogido	734,5	93,06	794,1	92,66	746,1	88,75

Lípidos apolares/polares	3,73	5,23	5,14
--------------------------	------	------	------

Control: pienso comercial.

Exp. OR: pienso comercial adicionado con un 11% de orujo de aceituna.

Exp. GT: pienso comercial adicionado con un 11% de grasa técnica de matadero.

Lípidos apolares: fracción eluida con cloroformo.

Lípidos polares: fracción eluida con acetona mas fracción eluida con metanol.

rimental GT, respectivamente.

La acetona es el eluyente que arrastra una menor cantidad de lípidos variando desde un 8,58% en el pienso Control a un 6,21% en el Experimental OR.

Los fosfolípidos, eluidos con metanol, constituyen la segunda fracción en orden de importancia en relación con la cantidad obtenida, con valores que alcanzan el 12,56% en el pienso Control; el 9,84% en el Experimental OR y el 8,49% en el Experimental GT.

Igualmente la relación lípidos apolares/polares varía en los distintos piensos, alcanzando valores de 3,73; 5,23 y 5,14 en los piensos Control, Experimental OR y Experimental GT respectivamente, lo que indica que la grasa adicionada era rica en lípidos apolares.

No se estudiaron los componentes de cada fracción debido a que de una parte no es ese el objeto de este estudio y de otra carece de sentido analizar detalladamente la grasa de un pienso cuyo origen es casi totalmente desconocido.

En lo único que se profundizó fué en la composición en ácidos grasos, para que sirviera de comparación con la de las distintas fracciones lipídicas obtenidas a partir de la musculatura de las truchas.

### III.5.3. Composición en ácidos grasos de los extractos lipídicos

Una vez conocida la riqueza en lípidos neutros y polares de la materia grasa de los piensos se pasó a analizar el contenido en ácidos grasos de las tres fracciones, es decir, de las eluidas con cloroformo, con acetona y con metanol. Para ello se analizaron por cromatografía en fase gaseosa alícuotas previamente transesterificadas según se describe en II.3.7.10.

La Tabla III.5 recoge los resultados obtenidos, expresados en porcentaje, sobre el total de ácidos grasos.

En la fracción de lípidos neutros los más abundantes son, sin lugar a dudas, el C-18:1 y C-16 que suponen más del 50% del total de los ácidos grasos. Le siguen en importancia los C-14, C-16:1, C-18, C-18:2, C-18:3 y C-22:1; las concentraciones relativas de cada uno de ellos dependen del tipo de que se trate, pero en cualquier caso nunca es inferior al 2%.

Cabe destacar la abundancia de C-22:6 y C-20:5 en los piensos Control y Experimental OR, cuya concentración está en torno al 3% e incluso llega a más del 6% en el C-22:6 del pienso Control. En el caso del pienso Experimental GT ninguno de estos dos ácidos grasos (C-22:6 y C-20:5) llega al 1%.

En la fracción de lípidos neutros se observa también un descenso del índice de iodo que es más acusado en el pienso al que se le adicionó grasa técnica de matadero (Experimental GT)



TABLA III.5

Ácidos grasos de las diferentes fracciones lipídicas extraídas de los  
piensos (% sobre el total de ácidos grasos)

Ac. graso	Lípidos neutros			Fracción eluida con acetona			Fosfolípidos		
	Control	Exp.OR	Exp.GT	Control	Exp.OR	Exp.GT	Control	Exp.OR	Exp.GT
C-14	3,80	3,11	2,95	2,69	5,36	3,50	2,74	2,51	0,96
N.I.	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-
N.I.	-	0,03	0,08	-	-	-	-	-	-
N.I.	0,31	0,32	0,29	0,43	0,48	0,46	0,40	0,31	0,48
N.I.	0,33	0,52	0,64	0,70	0,34	0,54	0,71	0,47	0,25
C-16	22,04	18,94	24,58	26,36	25,60	18,79	21,86	21,83	32,73
C-16:1	4,62	3,38	2,95	5,28	6,17	3,75	2,46	3,32	3,58
C-17	0,60	0,36	0,65	0,87	0,87	tr	-	0,21	tr
N.I.	0,75	0,40	0,49	1,75	1,05	0,49	0,82	0,29	0,64
C-18	6,37	6,37	14,99	1,75	6,57	7,89	7,90	8,90	6,84
C-18:1	29,26	38,36	35,40	20,78	24,99	21,05	23,83	20,58	21,27
C-18:2	11,44	12,31	9,75	17,85	16,31	20,04	15,40	18,49	12,12
C-20	0,25	0,32	0,29	0,35	0,12	0,24	0,09	0,10	0,12
C-18:3	3,49	3,51	2,71	6,58	4,99	5,70	4,82	4,45	1,87
C-20:1	0,60	0,50	0,19	0,69	0,70	0,31	0,32	0,22	1,10
C-20:2	tr	0,14	0,24	0,08	0,08	0,24	0,38	0,17	tr
C-20:3	0,06	0,32	0,20	0,25	0,08	0,63	0,40	0,53	0,12
C-22	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
C-22:1	3,17	2,89	1,16	2,80	0,98	3,50	3,66	3,51	2,50
C-22:2	0,50	0,23	0,09	tr	0,17	0,32	0,49	0,45	0,25
C-20:5	3,40	2,84	0,98	3,51	2,91	3,12	3,35	3,26	5,08
N.I.	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-
C-22:5	0,56	0,70	0,09	tr	0,10	0,67	1,10	0,84	0,77
C-22:6	6,57	3,16	0,93	6,83	1,16	7,35	7,58	8,72	8,06
Indice									
Iodo	112,02	103,47	70,52	124,02	91,62	130,32	124,29	130,05	115,01

Control: pienso comercial.

Exp. OR: pienso comercial adicionado con un 11% de orujo de aceituna.

Exp. GT: pienso comercial adicionado con un 11% de grasa técnica de matadero.

N.I.: No Identificado.

tr: trazas

Las determinaciones de los ácidos grasos de las fracciones eluidas con acetona demostraron que los ácidos grasos mayoritarios son los C-16, C-18:1 y C-18:2. Su suma en los tres piensos alcanza valores próximos al 60%. Le siguen en importancia los C-18, C-18:3 y C-22:6 que en el mejor de los casos llega al 8%.

El mayor índice de iodo fué el del pienso Experimental GT, con un valor de 130.

Igualmente en la fracción eluida con metanol se observa una preponderancia de los C-16, C-18:1 y C-18:2. En los tres piensos merece también destacarse un valor similar para el C-22:6 que alcanza aproximadamente un 8%. Los índices de iodo variaron entre 115 y 130.

La Tabla III.6 muestra el grado de insaturación de los ácidos grasos componentes de la grasa de los piensos.

En los lípidos neutros se observa un predominio de los insaturados y hasta los monoenoicos por sí solos alcanzan una concentración mayor que la de los saturados, salvo en el pienso Experimental GT. Los dienoicos también constituyen una fracción destacable, próxima al 11%.

En las fracciones eluidas con acetona y metanol se observa igualmente un predominio de los insaturados pero en ambos casos, a diferencia de los lípidos neutros, los saturados al-

TABLA III.6

Composición en ácidos grasos (%) de las diferentes fracciones lipídicas de los piensos de acuerdo al grado de saturación.

	Lípidos neutros			Fracción acetona			Fosfolípidos			
	Control	Exp.	OR	Exp.	GT	Control	Exp.	OR	Exp.	GT
Saturados	34,38	29,40		43,46		32,02	39,35	30,60	33,02	33,69 41,41
Monosaturados	38,02	45,86		39,96		29,55	32,84	29,73	31,15	27,95 28,76
Diosaturados	11,94	12,68		10,08		17,93	16,56	20,60	16,27	19,11 12,37
Trienos	3,55	3,83		2,91		6,83	5,07	6,33	5,22	4,98 1,99
Pentaenicos	3,96	3,54		1,07		3,51	3,01	3,79	4,45	4,10 5,85
Hexaenicos	6,57	3,16		0,93		6,83	1,16	7,35	7,58	8,72 8,06
No Identificados	1,48	1,43		1,50		2,88	0,82	1,00	1,26	0,95 0,73

Control: pienso comercial.

Exp. OR: pienso comercial adicionado con un 11% de orujo de aceituna.

Exp. GT: pienso comercial adicionado con un 11% de grasa técnica de matadero.

canzan siempre valores mayores que los monoenoicos. Por otra parte, los dienoicos en contraste también con los lípidos neutros alcanzan valores significativamente mayores.

La Tabla III.7 se ha confeccionado a fin de conocer la cantidad (mg/100g) de cada ácido graso que aportan los extractos secos de cada uno de los piensos.

Los valores recogidos en la Tabla III.7 se han expresado en términos de triglicéridos para el caso de los lípidos apolares y en términos de fosfatidilcolina para el caso de las fracciones eluidas con acetona y metanol habiéndolos calculado teniendo en cuenta: 1.- los resultados obtenidos por cromatografía en fase gaseosa (Tabla III.5) 2.- el coeficiente 0,995 como factor de corrección para convertir la cantidad total de ácido graso en triglicérido (Christie y col., 1970) 3.- el coeficiente 1,371 para transformar la cantidad de ácidos grasos totales de las fracciones polares tomando como modelo la fosfatidilcolina (Christie y col., 1970) 4.- en el caso de los lípidos apolares, su contenido en la materia grasa total (Tabla III.5) y en el de las fracciones eluidas con acetona y metanol, la suma de las concentraciones en dichas fracciones determinada previamente (Tabla III.4).

Los resultados obtenidos reflejan, como era de esperar, que las cantidades mayores que aportan los piensos corresponden a los ácidos grasos C-16, C-18:1 y C-18:2.

TABLA III.7

Contenido en ácidos grasos (mg/100 g extracto seco) de los piensos

Ac. graso	Pienso		
	Control	Experimental OR	Experimental GT
C-14	287,1	291,5	521,7
N.I.	-	1,9	-
N.I.	-	2,9	13,3
N.I.	26,0	29,7	57,1
N.I.	31,0	47,0	112,3
C-16	1767,7	1793,3	4527,7
C-16:1	353,2	323,2	554,1
C-17	43,5	32,6	104,7
N.I.	64,4	39,3	91,4
C-18	492,2	605,1	2566,6
C-18:1	2232,3	2490,5	6148,0
C-18:2	970,1	1193,9	2016,3
C-20	19,2	26,8	49,5
C-18:3	303,0	335,6	517,9
C-20:1	46,0	45,1	47,6
C-20:2	3,3	13,4	40,0
C-20:3	8,3	29,7	40,0
C-22	-	-	-
C-22:1	252,8	262,8	253,2
C-22:2	36,8	22,1	20,9
C-20:5	269,5	226,5	249,4
N.I.	5,9	-	-
C-24	91,2	29,7	9,5
C-24:1	30,9	61,4	57,1
N.I.	0,8	11,5	-
C-22:5	45,2	62,3	32,4
C-22:6	529,8	321,3	323,7
Total	7802,0	8282,8	18341,1

Control: pienso comercial.

Experimental OR: pienso comercial adicionado con un 11% de orujo de aceituna.

Experimental GT: pienso comercial adicionado con un 11% de grasa técnica de matadero.

N.I.: No Identificado.

Sin embargo, hay diferencias significativas en lo que se refiere a la cantidad que aporta cada pienso. Puede decirse, en términos generales, que el pienso preparado mediante la adición de grasa técnica de matadero (Experimental GT) aporta una cantidad de C-16 2,5 veces mayor que la de los otros dos; unas 5 veces más C-18, y unas 2,7 veces más C-18:1, aunque en este caso se observa también que en el pienso suplementado con orujo de aceituna (Experimental OR) el aporte de éste ácido graso es mayor; finalmente también proporciona unas 2 veces más C-18:2.

En contraposición, el aporte de ciertos ácidos grasos como C-20:5, C-22:5 y C-22:6 es mayor en el pienso Control debido, obviamente, a la mayor riqueza de este pienso en grasas procedentes de harina de pescado.

Merecen especial mención los C-18:2 y C-18:3 por su carácter de ácidos grasos esenciales. En relación al primero puede decirse que las necesidades de este ácido esencial de las truchas se satisfacen incluso cuando está en pequeñas cantidades (Castell, 1972). Bien es verdad que las cantidades de este ácido graso que aportan los piensos Experimentales OR y GT son mayores que las del Control, pero el aporte del Control puede considerarse como suficiente para el desarrollo normal de las truchas.

La abundante presencia de C-18:3 parece influir de una forma acusada en el desarrollo de la trucha (Lee, 1967; Higashi,

1966; Castell, 1972). En el pienso Experimental OR se observa una cantidad ligeramente mayor de C-18:3 que en el Control, y en el caso del pienso Experimental GT este aumento se multiplica por un factor de 1,7 en relación con el pienso Control.

La Tabla III.8 muestra el nivel de insaturación de los ácidos grasos que aportan 100 g de extracto seco de los tres diferentes piensos y la III.9 los porcentajes de ácidos grasos según el grado de saturación con respecto al total de ácidos grasos. Igualmente se ha incluido el índice de iodo calculado de cada uno de los piensos. En los tres tipos de piensos la relación saturados/monoenoicos/dienoicos está próxima a 3/3/1. Sin embargo, el índice de iodo de los tres piensos no es igual debido principalmente a las diferencias en ácidos grasos hexaenoicos de los mismos, siendo el pienso Experimental GT el que presenta un índice de iodo más bajo.

De la Tabla III.9 se desprende que la grasa con mayor índice de insaturación es la correspondiente al pienso Control disminuyendo en el pienso Experimental OR y haciéndolo de una forma mucho más acusada en el Experimental GT.

TABLA III.8

Grado de insaturación de los ácidos grasos de los piensos  
(mg/100 g extracto seco)

Acido graso	Pienso		
	Control	Experimental OR	Experimental GT
Saturados	2700,9	2779,0	7779,7
Monoenoicos	2915,2	3183,0	7060,0
Dienoicos	1010,2	1229,4	2077,2
Trienoicos	313,3	365,3	557,9
Pentaenoicos	314,7	288,8	281,8
Hexaenoicos	529,8	321,3	323,7
No Identificados	127,9	116,0	260,8

Control: pienso comercial.

Experimental OR: pienso comercial adicionado con un 11% de orujo de aceituna.

Experimental GT: pienso comercial adicionado con un 11% de grasa técnica de matadero.



TABLA III.9

Contenido en ácidos grasos (g/100 g) de los piensos de acuerdo con el grado de insaturación.

Acido graso	Pienso		
	Control	Experimental OR	Experimental GT
Saturados	34,00	30,43	42,27
Monoenoicos	36,42	43,28	38,21
Dienoicos	12,99	13,55	11,09
Trienoicos	4,04	4,02	3,10
Pentaenoicos	3,98	3,56	1,69
Hexaenoicos	6,72	3,58	2,03
No Identificados	1,57	1,34	1,40
Indice de Iodo	114,56	105,33	78,93

Control: pienso comercial

Experimental OR: pienso comercial adicionado con un 11% de orujo de aceituna

Experimental GT: pienso comercial adicionado con un 11% de grasa técnica de matadero.

### III.6 Composición lipídica de las truchas

#### III.6.1 Extracción del material lipídico

Procediendo según se indica en Material y Métodos (II. 3.6.3.) se extrajo la materia grasa de los músculos que sirvió tanto para estudiar la composición lipídica como para determinar su contenido en grasa. Los resultados han quedado recogidos en la Tabla III.3

#### III.6.2 Fraccionamiento del material lipídico en columnas de ácido silícico/celita (1/1)(p/p)

Procediendo de forma similar que en la separación de las fracciones apolares y polares de la grasa de los piensos (III.5.2) se realizaron cromatografías en columna de ácido silícico/celita (1/1)(p/p). Así se obtuvieron tres fracciones: la primera, eluida con cloroformo, compuesta por lípidos apolares y las otras dos, eluidas sucesivamente con acetona y metanol, por lípidos polares.

La Tabla III.10 recoge la marcha del fraccionamiento de las distintas muestras cromatografiadas, así como el rendimiento de cada una de las cromatografías. Lo más destacable radica en el rendimiento de las cromatografías que, salvo en el lote C-45 y GT-45 en que fué próximo al 90%, alcanzan valores próximos al 100%.

TABLA III.10

Resultados de las cromatografías en columna de ácido silícico/celita (1/1) (p/p) de los extractos lipídicos de los diferentes lotes de truchas

	Lote de truchas									
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
Muestra cromatografiada (mg)	1175,1	984,2	1016,9	1308,4	1041,7	1182,1	1370,2	1216,3	1083,5	1297,7
Fracción eluida con cloroformo (mg)	771,8	430,9	612,5	759,3	631,4	750,6	937,5	842,1	762,2	957,5
Fracción eluida con acetona (mg)	20,2	81,0	74,3	51,0	32,5	10,3	49,6	26,7	40,1	16,0
Fracción eluida con metanol (mg)	342,4	373,7	348,0	369,3	372,0	404,6	407,9	336,1	318,7	333,6
Total recogido (mg)	1134,4	885,6	1034,8	1179,6	1035,9	1165,5	1395,0	1204,9	1121,0	1307,1
Rendimiento (%)	96,3	89,9	101,7	90,1	99,4	98,5	101,8	99,0	103,4	100,7

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

A partir de los datos obtenidos en la Tabla III.10 se han confeccionado las Tablas III.11, III.12 y III.13 en las que se muestran respectivamente los porcentajes de las tres fracciones (eluidas con cloroformo, acetona y metanol) con respecto a grasa total, tejido muscular y extracto seco del mismo.

Las Figuras III.9, III.10 y III.11 recogen la evolución de las tres fracciones y de la grasa total con respecto al tiempo de experimentación. Los valores se expresan en g/100g de extracto seco.

Para poder comparar mejor el efecto de la dieta sobre cada una de las fracciones se han preparado las Figuras III.12, III.13, III.14 y III.15 en las que se muestra la evolución de cada una de las fracciones, durante el periodo experimental en los diferentes lotes de truchas.

La Figura III.15 muestra la evolución de la fracción eluida con acetona observándose, como más tarde se mostrará, que entre los componentes de esta fracción existen cantidades variables de fosfolípidos. Por ello se ha calculado (Tabla III.14) y representado (Figura III.16) también la evolución de la fracción polar en su conjunto (fracciones acéticas y metanólicas).

En la Tabla III.14 y en la Figura III.17 se observa

TABLA III.11

Lípidos neutros, lípidos eluidos con acetona y fosfolípidos de los diferentes lotes de truchas (g/100 g grasa del tejido muscular)

Lote	Lípidos neutros (cloroformo)	Acetona	Fosfolípidos (metanol)
Inicial	68,04	1,78	30,18
C-45	48,65	9,14	42,20
OR-45	59,19	7,18	33,63
GT-45	64,37	4,32	31,30
C-70	60,95	3,14	35,91
OR-70	64,40	0,88	34,71
GT-70	67,20	3,55	29,24
C-100	69,89	2,21	27,89
OR-100	67,99	3,57	28,43
GT-100	73,25	1,22	25,52

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

TABLA III.12

Lípidos neutros, lípidos eluidos con acetona y fosfolípidos de los diferentes lotes de truchas (g/100 g tejido muscular)

Lote	Lípidos neutros (cloroformo)	Acetona	Fosfolípidos (metanol)
Inicial	1,61	0,04	0,70
C-45	1,07	0,20	0,93
OR-45	1,34	0,16	0,76
GT-45	1,88	0,12	0,91
C-70	1,42	0,07	0,83
OR-70	1,70	0,02	0,91
GT-70	2,06	0,10	0,89
C-100	1,90	0,06	0,75
OR-100	1,64	0,08	0,68
GT-100	2,13	0,03	0,74

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado con orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

TABLA III.13

Lípidos neutros, fracción eluida con acetona y fosfolípidos del tejido muscular de los diferentes lotes de truchas (g/100 g extracto seco)

Lote	Lípidos neutros (cloroformo)	Acetona	Fosfolípidos (metanol)
Inicial	8,02	0,21	3,48
C-45	5,00	0,93	4,35
OR-45	6,66	0,79	3,77
GT-45	8,80	0,56	4,26
C-70	6,54	0,32	3,82
OR-70	7,98	0,09	4,27
GT-70	9,49	0,46	4,10
C-100	8,72	0,27	3,44
OR-100	7,52	0,36	3,12
GT-100	9,29	0,13	3,22

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

TABLA III.14

Lípidos polares (fracciones eluidas con acetona y metanol) del tejido muscular de los diferentes lotes de truchas

Lote	Lípidos polares			LA / LP
	1	2	3	
Inicial	0,74	3,69	31,96	2,13
C-45	1,13	5,28	51,34	0,94
OR-45	0,92	4,56	40,81	1,45
GT-45	1,03	4,82	35,62	1,80
C-70	0,90	4,14	39,05	1,56
OR-70	0,93	4,36	35,59	1,81
GT-70	0,99	4,56	32,79	2,05
C-100	0,81	3,71	30,10	2,32
OR-100	0,76	3,48	32,00	2,12
GT-100	0,77	3,35	26,74	2,74

1.- g/100 g tejido muscular

2.- g/100 g extracto seco

3.- g/100 g total lipídico

LA / LP : lípidos apolares/lípidos polares

Inicial : lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado con orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.



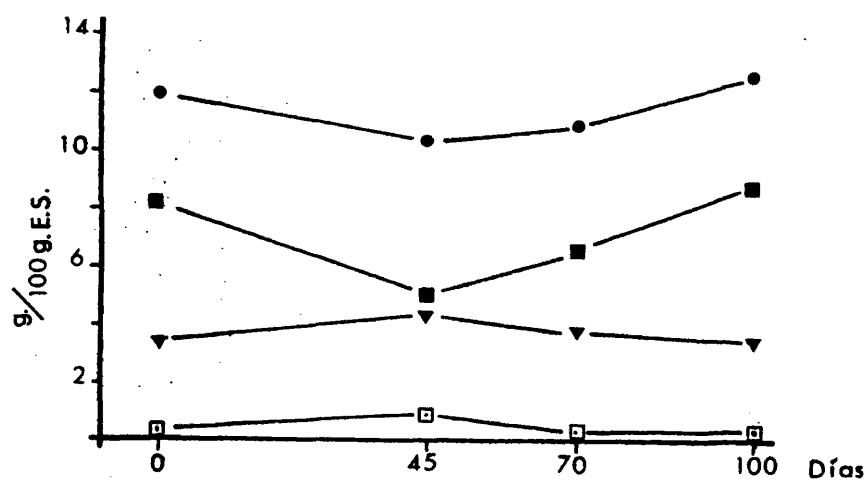


Figura III.9. Evolución del material lipídico total (●) y de las fracciones lípidos neutros (■), fosfolípidos (▼) y lípidos eluidos con acetona (□) procedentes del extracto seco (E.S.) del tejido muscular de truchas alimentadas con pienso comercial (Lote C).

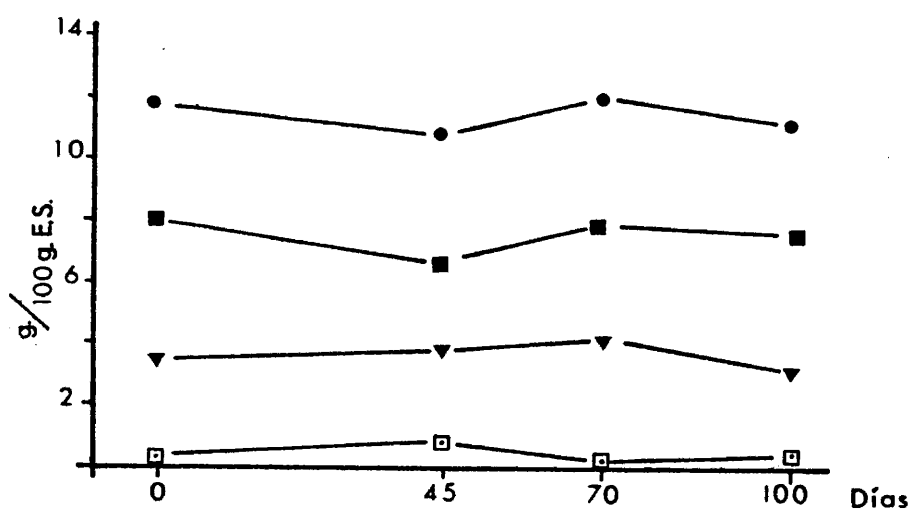


Figura III.10. Evolución del material lipídico total (●) y de las fracciones lípidos neutros (■), fosfolípidos (▼) y lípidos eluidos con acetona (□) procedentes del extracto seco (E.S.) del tejido muscular de truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna (Lote OR).

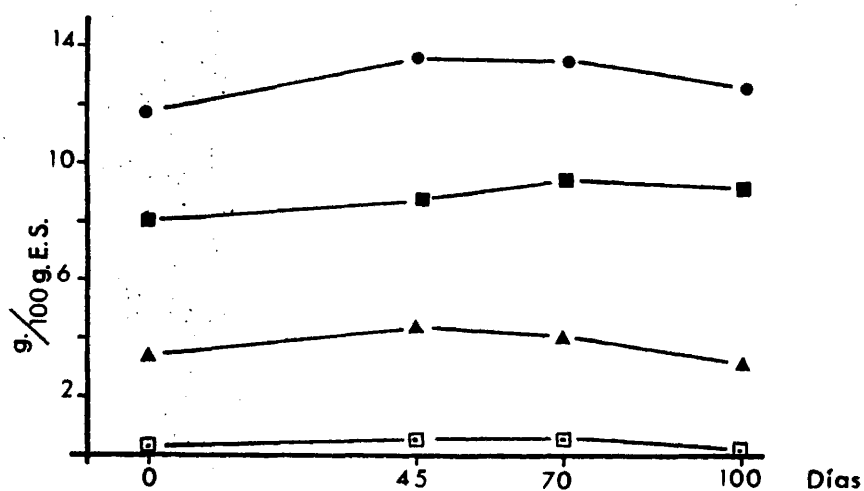


Figura III.11. Evolución del material lipídico total (●) y de las fracciones lípidos neutros (■), fosfolípidos (▲) y lípidos eluidos con acetona (□) procedentes del extracto seco (E.S.) del tejido muscular de truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero (Lote GT).

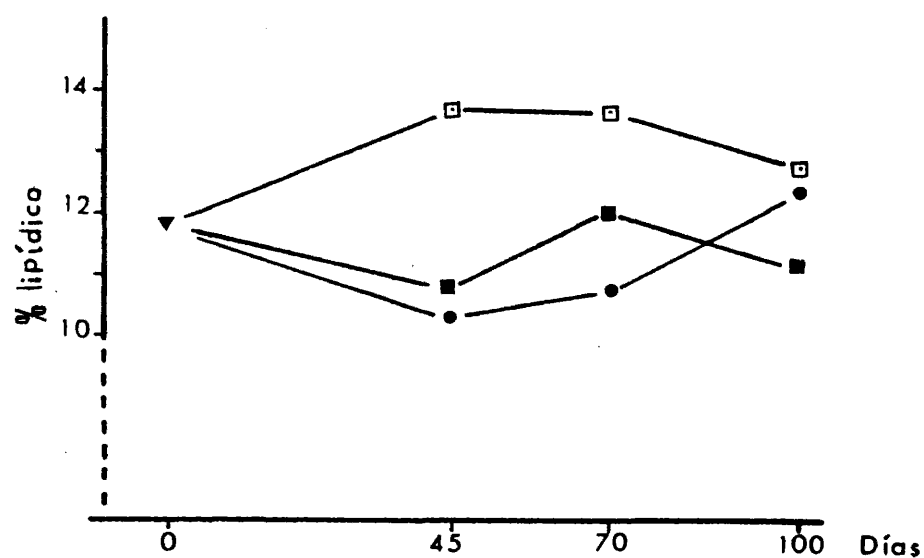


Figura III.12. Evolución del contenido lipídico del extracto seco (g/100g) del tejido muscular de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado.

▼ Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

● Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■ Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□ Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

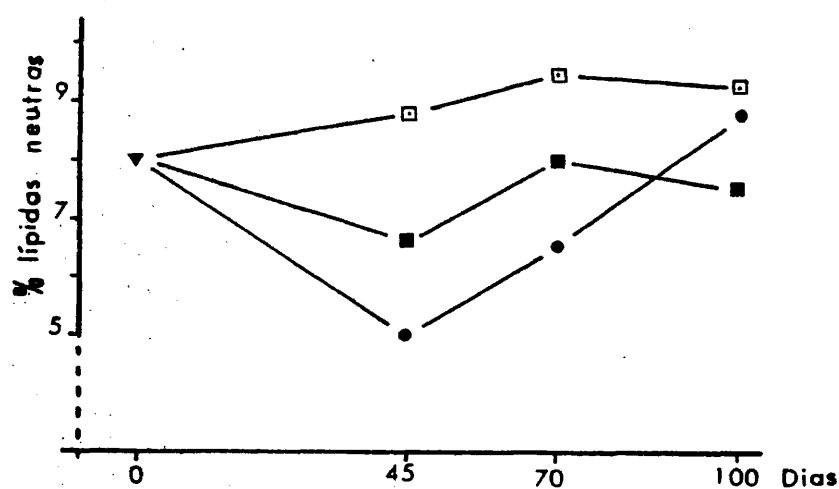


Figura III.13. Evolución de la fracción lípidos neutros del extracto seco (g/100g) del tejido muscular, eluidos con cloroformo, de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado.

▼ Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

● Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■ Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□ Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

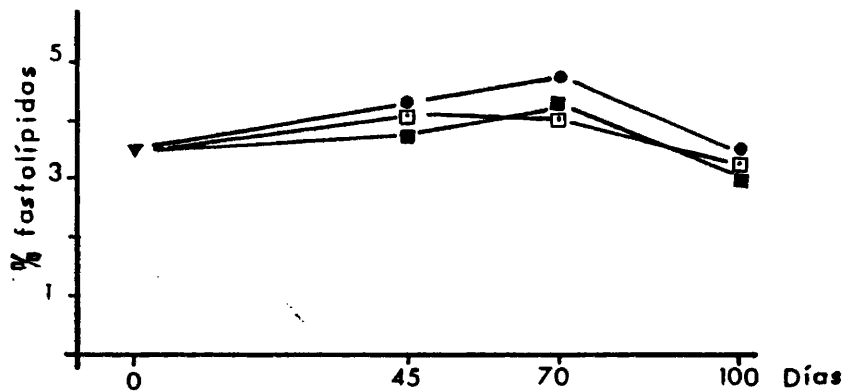


Figura III.14. Evolución de la fracción fosfolípidos del extracto seco (g/100g) del tejido muscular, eluidos con metanol, de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado.

▼Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

●Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

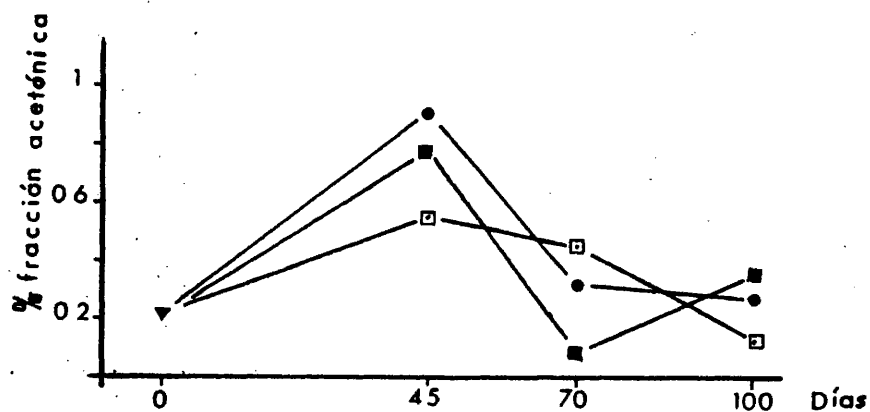


Figura III.15. Evolución de la fracción eluida con acetona del extracto seco (g/100g) del tejido muscular de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado.

▼ Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

● Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■ Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□ Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

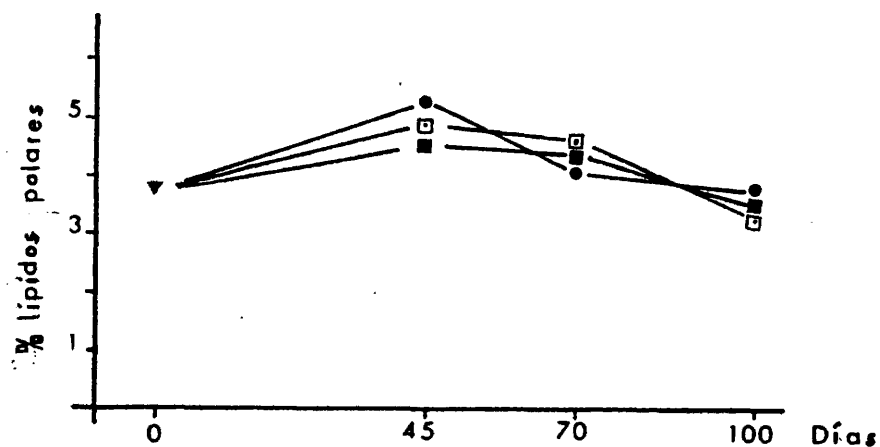


Figura III.16. Evolución de los lípidos polares (g/100g extracto seco), fracción eluida con acetona más fracción eluida con metanol, del tejido muscular de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado

- ▼ Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales
- Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial
- Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna
- Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.



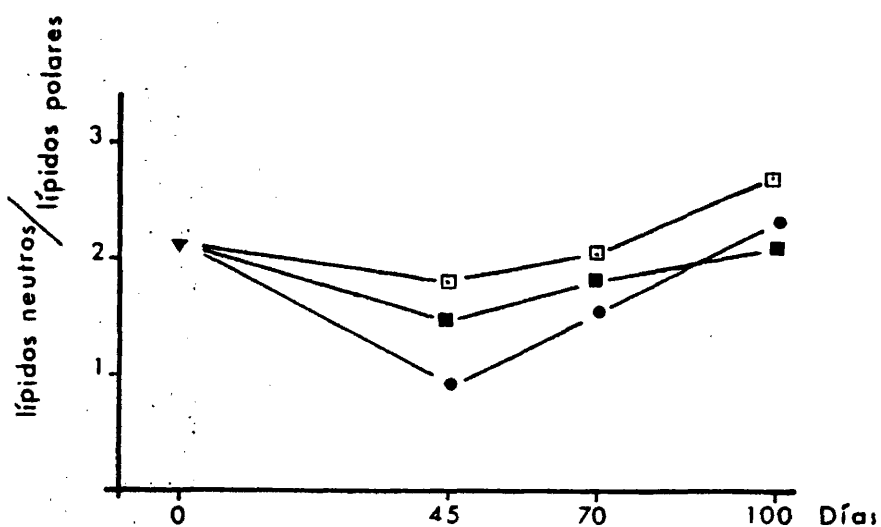


Figura III.17. Cambios experimentados en la relación lípidos neutros/lípidos polares del tejido muscular de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado.

▼Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

●Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□Lote CT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado con grasa técnica de matadero.

la evolución de la relación lípidos apolares/polares.

III.6.3 Identificación de la fracción eluida con cloroformo  
(lípidos apolares)

III.6.3.1 Fraccionamiento de los lípidos apolares en colum-  
nas de ácido silícico/celita (1/1)(p/p)

De acuerdo con Hirsch y Ahrens (1958) las distintas fracciones que componen los lípidos neutros pueden separarse por cromatografías en columnas de ácido silícico/celita eluyéndolas con hexano e incrementando progresivamente el porcentaje de éter etílico de aquel disolvente hasta llegar a un 100% de éter. Según dichos autores, con este procedimiento se aíslan totalmente los hidrocarburos, ésteres del colesterol, triglicéridos y monoglicéridos, y la casi totalidad del colesterol libre y de los diglicéridos.

Realizada una prueba con una alícuota de muestra de trucha y estudiadas todas y cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía en lámina fina, se observó, que en nuestras condiciones de trabajo no se aislaban las fracciones como indican los autores de la técnica: los hidrocarburos y ésteres del colesterol se eluían tanto en la fracción 0% como en la de 2% de éter etílico; la mayoría de los triglicéridos aparecían normalmente en la fracción hexano-éter

etílico (95/5)(v/v), como indican los autores, pero también se detectaron, tanto en la fracción anterior (2% éter etílico) como en la posterior (15% éter etílico). Por ello, dado que el desarrollo de la técnica original de Hirsch y Ahrens (1958) no se adaptaba a nuestros fines se modificó ligeramente lo que nos permitió separar los lípidos apolares en dos fracciones: una eluida con hexano-éter etílico (97/3)(v/v) (véase II.3.7.3.) y otra con cloroformo. De esta forma se separaron la totalidad de los triglicéridos (componente mayoritario) de los mono- y diglicéridos, aumentando la concentración de los componentes de ésta última fracción eluida con cloroformo.

Los resultados se expresan en la Tabla III.15. Se observa que la fracción eluida con hexano-éter etílico (97/3)(v/v), representa valores comprendidos entre el 86 y el 97% del total de los lípidos apolares.

III.6.3.2 Cromatografía en capa fina de las fracciones apolares eluidas de la columna de ácido silícico/celita (1/1)(v/v).

Los extractos eluidos de las columnas de ácido silícico/celita (1/1)(v/v) se concentraron en rotavapor y para su identificación se cromatografiaron en capa fina de silicagel G-60 utilizando como fase móvil éter de petróleo-éter etílico-ácido acético (80/20/1)(v/v/v) obteniendo los siguientes resultados:

- en la fracción eluida con hexano/éter etílico

TABLA III.15

Resultados de las cromatografías en columnas de ácido silícico/celulosa (1/1) (p/p) de la fracción

lípidos neutros

	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	Lote de truchas				C-100	OR-100	GT-100
					C-70	OR-70	GT-70	C-100			
Muestra cromatografiada (mg)	295,9	124,7	216,8	247,6	250,5	305,3	233,8	210,8	228,9	179,4	
Fracción eluida con Hexano/Eter etílico (97/3) (v/v) (mg)	273,0	112,4	197,5	228,5	223,5	248,2	207,0	185,6	175,5	161,6	
Fracción eluida con Cloroformo (mg)	23,1	15,7	21,5	6,0	15,9	36,0	16,1	17,6	28,3	11,3	
Total (mg)	296,1	128,1	219,0	234,5	239,4	284,2	223,1	203,2	203,8	172,9	
Rendimiento (%)	100,0	102,7	101,0	94,7	95,5	93,1	95,4	96,4	89,1	96,4	

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

(97/3)(v/v) se detectaron 9 manchas (Fig. III.18) de Rfs. 0,22; 0,29; 0,35; 0,37; 0,44; 0,66; 0,75; 0,95 y 0,97.

- en la fracción eluida con cloroformo (Fig. III.18) se detectaron 5 manchas de Rfs. 0,018; 0,16; 0,22; 0,29 y 0,35.

Los Rfs. y los reactivos pertinentes para la identificación de los diversos componentes demostraron que, en realidad, no se trataba de 14 manchas diferentes ya que 3 de ellas (manchas números 3, 4 y 5) aparecieron en las dos fracciones y como a continuación se expondrá correspondieron, respectivamente, al colesterol libre, a una sustancia no identificada y a los ácidos grasos libres.

El estudio conjunto de las manchas obtenidas a partir de las dos fracciones (Fig. III.18 y Tabla III.16) permitió la identificación de las mismas:

- la mancha nº1 presentó un Rf de 0,018, idéntico al de un patrón de monoestearina cromatografiado conjuntamente; fué además positivo a los reactivos generales de iodo y ácido sulfúrico y al de Schiff, específico de grupos OH-adyacentes. Se identificó por lo tanto como monoglicérido.

- la mancha nº2 mostró un Rf de 0,16 próximo al de los patrones de los diglicéridos 1- 3- dipalmitina y 1- 2- dipalmitina, siendo sólo positiva a los reactivos generales.

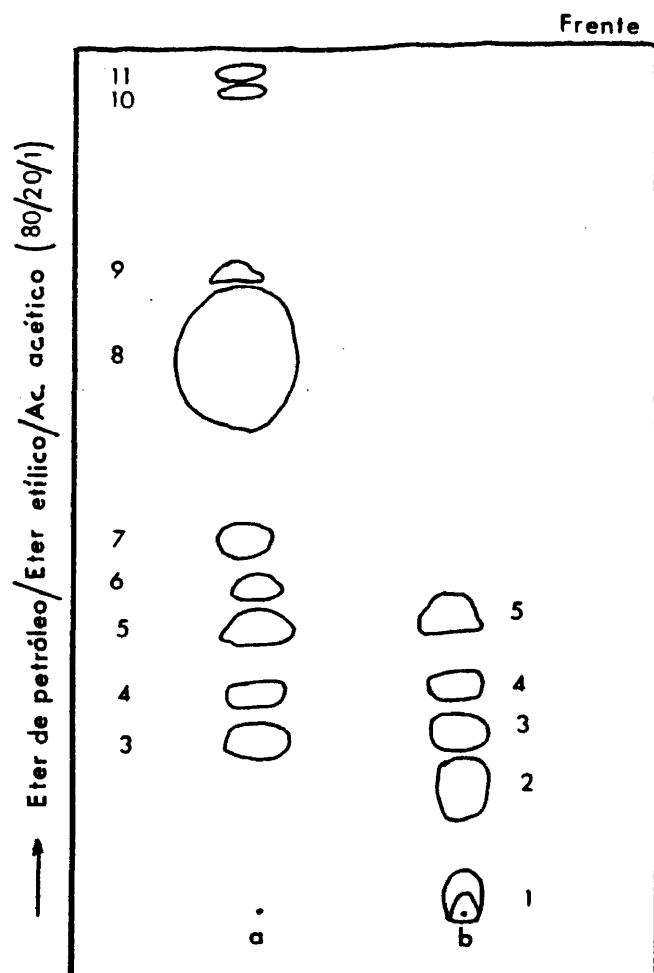


Figura III.18. Cromatografía en capa fina de los lípidos apolares.

a. Fracción eluida con hexano/éter etílico (97/3) (v/v)

b. Fracción eluida con cloroformo

1. Monoglicérido 2. Diglicérido 3. Colesterol

4. No Identificado 5. Ácido graso libre

6. No Identificado 7. Tocoferol 8. Triglicérido

9. No Identificado 10. Hidrocarburo

11. Esteres del colesterol.

TABLA III.16

Comportamiento frente a los reactivos utilizados de cada una de las manchas de la fracción  
lípidos neutros y sus Rf's correspondientes

Mancha	Rf	I <sub>2</sub>	Ac. sulfúrico	Coolesterol y ésteres	Tocoferoles	Acidos grasos libres	Schiff	Identificación
1	0,018	+	+	-	-	-	+	Monoglicérido
2	0,16	+	+	-	-	-	-	Diglicérido
3	0,22	+	+(violeta)	+	-	-	-	Colesterol
4	0,29	+	+	-	-	-	-	No identificado
5	0,35	+	+	-	-	+	-	Acido graso libre
6	0,37	+	+	-	-	-	-	No identificado
7	0,46	+	+	-	+	-	-	Tocoferol
8	0,66	+	+	-	-	-	-	Triglicérido
9	0,75	+	+	-	-	-	-	No identificado
10	0,95	+	+	-	-	-	-	Hidrocarburo
11	0,97	+	+(violeta)	+	-	-	-	Esteres del colesterol

\*Fase móvil: éter de petróleo/éter etílico/ácido acético (80/20/1)(v/v/v)

Se caracterizó como diglicérido.

- la mancha nº3 mostró una movilidad cromatográfica (Rf 0,22) igual a la de un patrón de colesterol libre; fué positiva al reactivo de Lowry (1968), específico para el colesterol y sus ésteres y adquirió una tonalidad violeta, característica de los 3-hidroxiesteroides con doble enlace en posición  $\Delta^5$ , con el reactivo del ácido sulfúrico; se identificó por tanto como colesterol libre.

- la mancha nº4 de Rf 0,29, detectada al igual que la anterior en las dos fracciones, se mostró positiva sólo a los reactivos generales, no pudiéndose caracterizar.

- la mancha nº5, detectada también en las dos fracciones, se caracterizó como ácidos grasos libres al presentar un Rf de 0,35 igual al del ácido oleico cromatografiado conjuntamente y al mostrarse positiva al reactivo específico para ácidos grasos libres de Dudzinski (1967).

- la mancha nº6 de Rf 0,37 no pudo identificarse.

- la mancha nº7, mostró un Rf de 0,46 igual que el de un patrón de D-L- $\alpha$  tocoferol y dió reacción positiva al reactivo del 2-2'dipiridilo. Se caracterizó como tocoferol.

- la mancha nº8 fué la que ocupó una superficie mayor, mostró un Rf de 0,66 idéntico al de un triglicérido patrón (trioleína). Se caracterizó, por tanto, como triglii



céfido.

- la mancha n°9 mostró un Rf de 0,75 distinto al de todos los patrones cromatografiados y no reaccionó con ningún reactivo específico. Siempre se observó muy próxima, pero claramente separada, de la mancha correspondiente a los triglicéridos. Es posible que se trate de algún triglicérido claramente más apolar que los que originan la mancha n°8 pero, en cualquier caso no se pudo identificar categóricamente. A la hora de su aislamiento por cromatografía preparativa en capa fina para la cuantificación y estudio de los ácidos grasos componentes, se arrastró conjuntamente con la fracción triglicéridos.

- las manchas n°10 y n°11 mostraron unos Rfs próximos, de 0,95 y 0,97 respectivamente, pero pudieron diferenciarse por el reactivo del ácido sulfúrico (una de ellas adquirió tonalidad violácea) y de Lowry (una de ellas tomó igualmente color violáceo) pero en ambos casos no se observaba una delimitación precisa entre una y otra. La que tomó tonalidad violácea con ambos reactivos se caracterizó como colesterol esterificado y, de acuerdo con el criterio de Zumalacárregui y Burgos (1975), se consideró que era la mancha superior de Rf 0,97 identificándose la otra como hidrocarburos.

#### III.6.4 Cuantificación de las principales sustancias que componen la fracción de lípidos apolares

Ante la imposibilidad de aislar en capa fina una cantidad suficiente de tocoferol y debido al desconocimiento de la naturaleza de las manchas no identificadas, de las 11 sustancias detectadas sólo se cuantificaron siete (ésteres del colesterol, hidrocarburos, triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol, di- y monoglicéridos) que representaron alrededor del 90% del total de lípidos apolares.

##### III.6.4.1 Colesterol libre y sus ésteres

Siguiendo el procedimiento descrito en II.3.7.8.1. se sometió a saponificación una alícuota de lípidos apolares. En el insaponificable obtenido se determinó el colesterol por la técnica de Moore y Bauman (1952). Por otra parte, se extrajo colesterol libre a partir de diversas cromatografías preparativas, en capa fina y por la técnica de Moore y Bauman (1952) se determinó igualmente el colesterol obtenido.

La diferencia entre los valores de colesterol obtenidos a partir del insaponificable y del extracto procedente de la capa fina, se consideró como colesterol derivado del esterificado. El total de ésteres de colesterol de cada muestra se expresó en términos de colesterol oleato.

Las Tablas III.17, III.18 y III.19 recogen los resultados. La tasa de colesterol libre es similar en todas las muestras (Tabla III.17), no superando nunca el 3,5% al que se llegó con el colesterol procedente de lípidos apolares de tejido muscular de truchas alimentadas con pienso comercial durante 45 días. El valor mínimo se situó en torno al 1,5% en el obtenido de los lípidos apolares procedentes del tejido muscular de las truchas alimentadas durante 100 días con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

Las tasas de ésteres del colesterol de las diferentes muestras fueron, en todos los casos, inferiores a las del colesterol salvo en el lote Inicial y en el lote alimentado con pienso comercial durante 100 días (C-100).

#### III.6.4.2 Ácidos grasos libres

De acuerdo con la metodología descrita en II.3.7.8.2 se realizaron diversas cromatografías preparativas en capa fina y se extrajeron las bandas correspondientes a los ácidos grasos libres que, posteriormente, se valoraron con NaOH 0,005N.

Los resultados se recogen en las Tablas III.17, III.18 y III.19 donde el total de ácidos grasos de cada muestra se expresó en relación con los lípidos apolares, contenido graso total y extracto seco del tejido muscular, respecti-

TABLA III.17

Principales componentes de la fracción lípidos neutros (g/100g lípidos neutros)

Componente	Lote									
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
Monoglicérido	2,43	1,52	1,42	0,95	1,84	1,78	1,51	1,82	1,53	1,49
Diglicérido	2,66	2,53	2,68	1,91	2,67	3,35	2,63	2,07	1,87	2,13
Colesterol	1,55	3,49	2,00	2,14	2,45	2,18	1,56	1,76	1,74	1,48
Ácidos grasos libres	3,27	1,75	2,75	1,55	3,58	1,80	3,27	2,53	1,61	1,44
Triglicéridos	72,17	75,83	79,51	83,87	77,26	77,45	71,19	75,83	75,60	74,23
Hidrocarburos	3,04	4,50	2,17	4,41	4,57	3,55	2,87	2,55	5,17	2,23
Esteres del colesterol*	1,85	1,11	1,09	0,17	0,61	1,40	1,25	2,99	0,79	1,78
Total	86,97	90,73	91,62	94,99	93,59	91,51	84,28	89,55	88,31	84,78

\*en términos de colesterol ceto

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales  
 C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado  
 de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.  
 45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

TABLA III.18

Principales componentes de la fracción lípidos neutros (mg/g materia grasa total)

Componente	Lote									
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
Monoglicérido	16,53	7,40	8,40	6,11	11,21	11,40	10,14	12,72	10,40	10,91
Diglicérido	18,09	12,30	15,86	12,29	16,27	21,57	17,67	14,46	12,71	15,60
Colesterol	10,54	16,97	11,83	13,77	14,93	14,03	10,48	12,30	11,83	10,84
Ácido graso libre	22,25	8,51	16,27	9,97	21,80	11,59	21,97	17,68	10,94	10,54
Triglicérido	491,04	368,91	470,61	539,87	470,90	498,77	478,39	529,97	514,00	543,73
Hidrocarburo	20,68	21,89	12,84	28,38	27,85	22,86	19,28	17,82	35,15	16,33
Esteres del colesterol <sup>A</sup>	12,58	5,40	6,45	1,09	3,71	9,01	8,40	20,89	5,37	13,03

<sup>A</sup>En términos de colesterol oleato

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

TABLA III.19

Principales componentes de la fracción lípidos neutros (mg/g extracto seco tejido muscular)

Componente	Lote							
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100 OR-100 GT-100
Monoglicérido	1,94	0,76	0,94	0,83	1,20	1,42	1,43	1,58 1,15 1,38
Diglicérido	2,13	1,26	1,78	1,68	1,74	2,67	2,49	1,80 1,40 1,97
Colesterol	1,24	1,74	1,33	1,88	1,60	1,74	1,48	1,53 1,30 1,37
Acido graso libre	2,62	0,87	1,83	1,36	2,34	1,43	3,10	2,20 1,21 1,33
Triglicérido	57,88	37,91	52,95	73,80	50,52	61,80	67,56	66,12 56,85 68,95
Hidrocarburo	2,43	2,25	1,44	3,88	2,98	2,83	2,72	2,22 3,88 2,07
Esteres del colesterol <sup>a</sup>	1,48	0,55	0,72	0,15	0,39	1,11	1,18	2,60 0,59 1,65

<sup>a</sup>en términos de colesterol oleato

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial o pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

vamente.

Las apreciaciones más significativas quizás se desprenden de la Tabla III.17; los valores alcanzados por los ácidos grasos libres se aproximan a los del colesterol libre; el valor máximo es un 3,5% del total de lípidos apolares para el lote C-70 (alimentado con pienso comercial durante 70 días) y el mínimo, 1,44%, al GT-100 (alimentado con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero durante 100 días). En cualquier caso las diferencias entre los distintos lotes no son destacables.

#### III.6.4.3 Hidrocarburos

La cuantificación de estas sustancias se hizo según se indica en II.3.7.8.3 y los resultados obtenidos se muestran en las Tablas III.17, III.18 y III.19.

En general y según se aprecia en la Tabla III.17 los resultados están comprendidos entre el 2 y 5%.

#### III.6.4.4 Glicéridos

Es habitual cuantificar los tres tipos de glicéridos (tri-, di- y monoglicéridos) por pesada independientemente del material que constituya el objeto de la investigación (López, 1972; Ordóñez, 1974; Fernández, 1977). No obstante, qui

z  este método ocasione errores debidos a impurezas procedentes del silicagel (Komarek, 1964).

En las investigaciones que describe esta tesis las cuantificaciones de glicéridos se hicieron por espectrofotometría I.R. (véase II.3.7.8.5) siguiendo, en esencia, el método descrito por Freeman y col. (1952) y los resultados se compararon con los obtenidos utilizando el método gravimétrico.

Con el objeto de no llegar a conclusiones erróneas se comprobó previamente la pureza de los glicéridos obtenidos a partir de cromatografías preparativas en capa fina. Para ello se realizó un espectro I.R. del glicérido aislado y del patrón correspondiente. En el caso de los triglicéridos se utilizó como patrón triole ina (99% de pureza); para los diglicéridos se utilizó dipalmitina (mezcla de isómeros 1,2 y 1,3 con 99% de pureza) y en el de los monoglicéridos se empleó monoestearina (mezcla del isómero 2-9% y 90% del isómero 1-).

Las Figuras III.19, III.20 y III.21 muestran los espectros I.R. antes mencionados. Los de los triglicéridos se realizaron depositando una película de triglicérido en la superficie de una placa de NaCl. La cantidad de di- y monoglicéridos obtenida por raspado y posterior percolación de la silicagel de la capa fina es siempre muy pequeña, dada



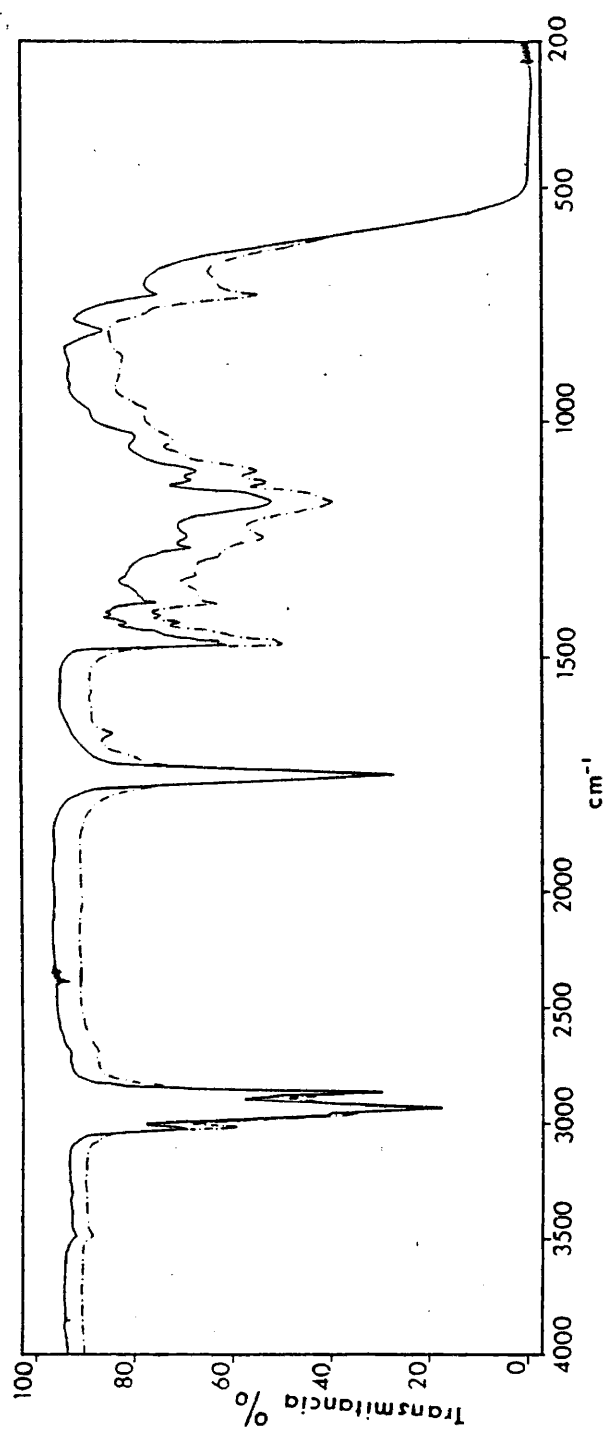


Figura III.19. Espectro infrarrojo (entre placas de NaCl) de un patrón de trioleína (----) y de tríglicéridos de trucha aislados por cromatografía de capa fina (—).

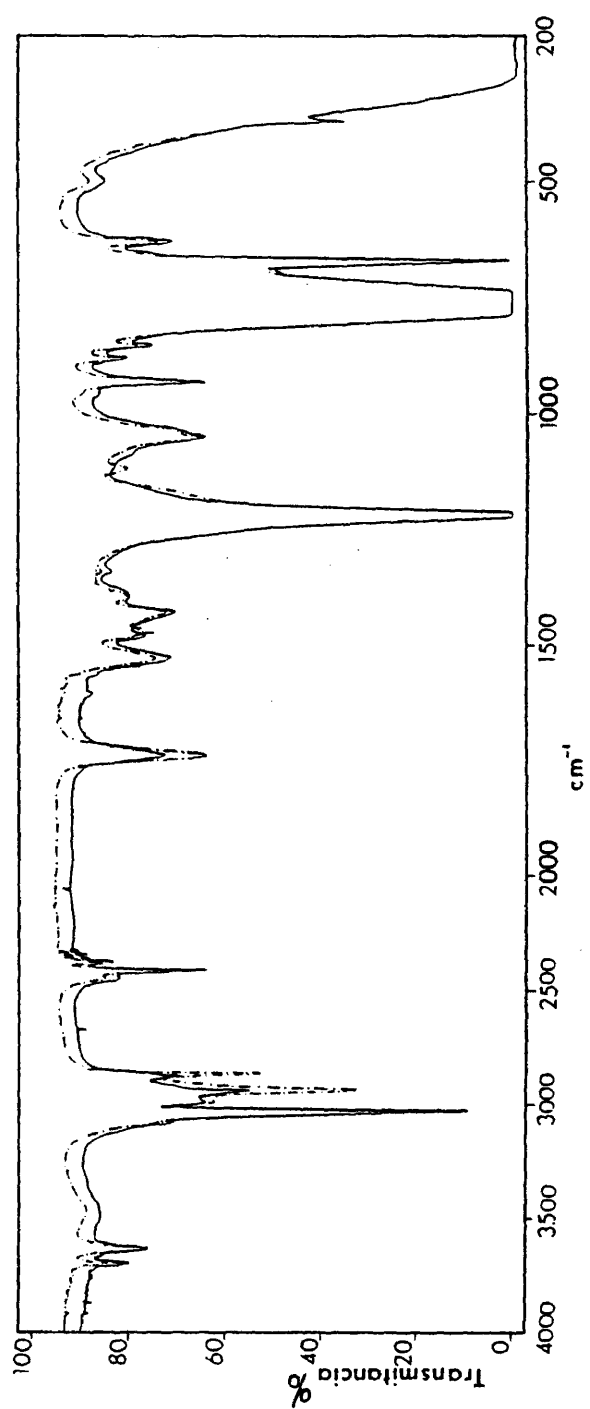


Figura III.20. Espectro infrarrojo (en cloroformo) de un patrón de dipalmitina (---) y de diglicéridos de trucha aislados por cromatografía de capa fina (—).

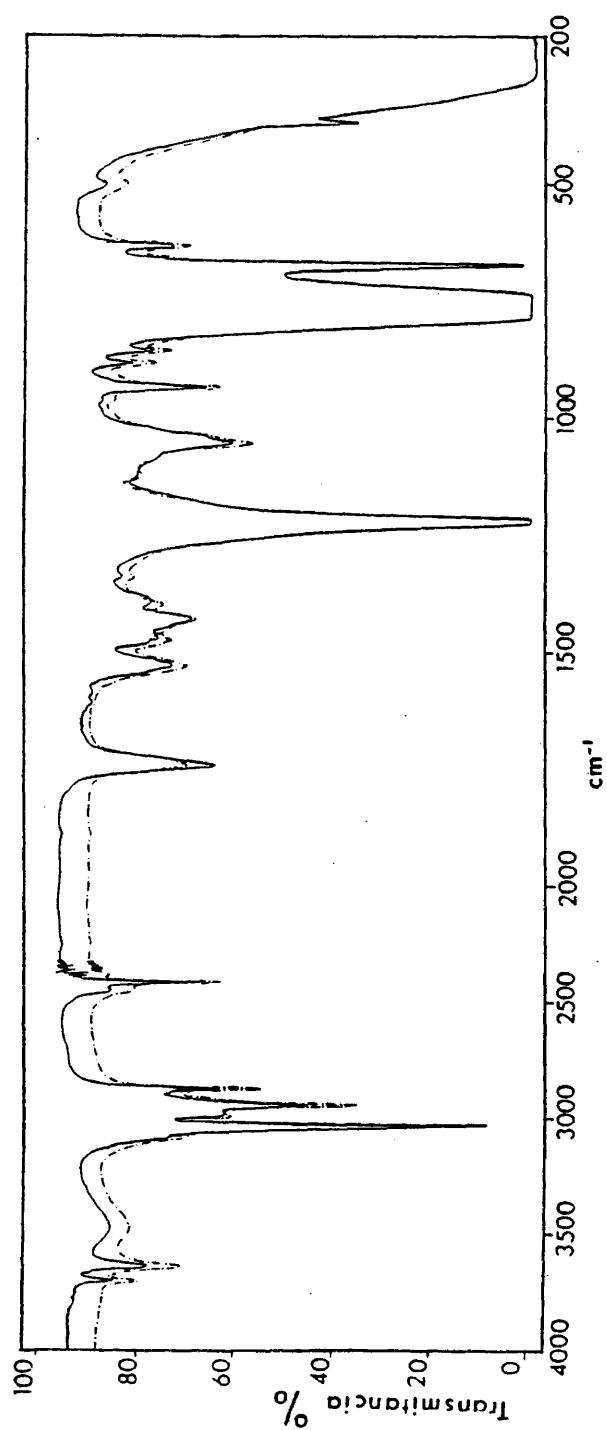


Figura III.21. Espectro infrarrojo (en cloroformo) de un patrón de monoestearina (---) y de monoglicéridos de trucha aislados por cromatografía de capa fina (—).

la escasa concentración de estos glicéridos en el músculo de las truchas y, por tanto, insuficiente para la realización del espectro I.R. entre placas de NaCl. Por ello, el espectro de los glicéridos parciales y de sus patrones se efectuó en una disolución clorofórmica. No obstante se realizó también el espectro I.R. entre placas de NaCl de los patrones de dipalmitina y monoestearina (Fig. III.22 y III.23).

En los tres casos, los espectros obtenidos de muestras y patrones prácticamente se superponían, lo que confirmó la pureza de las muestras obtenidas a partir de la capa fina. Comprobada la pureza de los mismos se procedió a su cuantificación.

#### III.6.4.4.1. Triglicéridos

La Tabla III.20 muestra los valores obtenidos por espectrofotometría I.R. y gravimetría. Como puede apreciarse los valores obtenidos son prácticamente iguales.

En las Tablas III.17, III.18 y III.19 se aprecian los valores alcanzados por los triglicéridos (determinados por espectrofotometría I.R.) respecto a los lípidos apolares, materia grasa total y extracto seco del tejido muscular, respectivamente.

Como era de esperar, los triglicéridos representan, en todos los casos, el componente mayoritario con valores nunca inferiores al 70% respecto del total de lípidos apolares (Tabla III.17). El valor máximo, 83,87%, se obtuvo en el

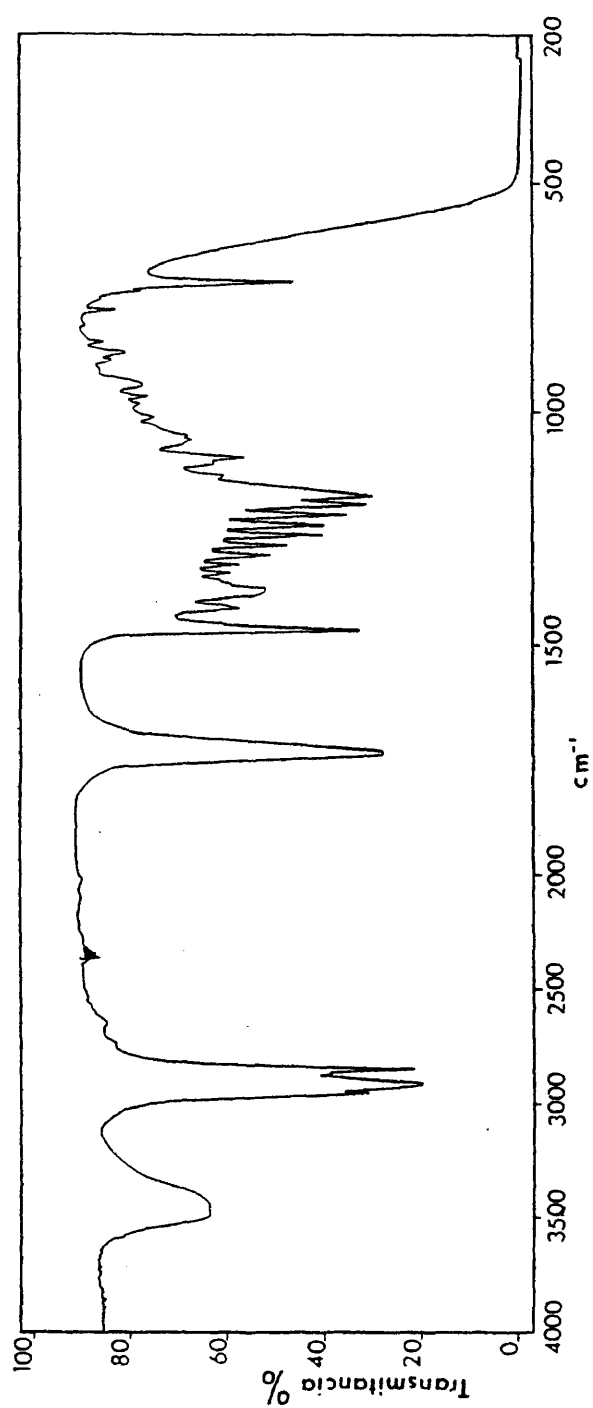


Figura III.22. Espectro infrarrojo (entre placas de NaCl) de un patrón de dipalmitina.

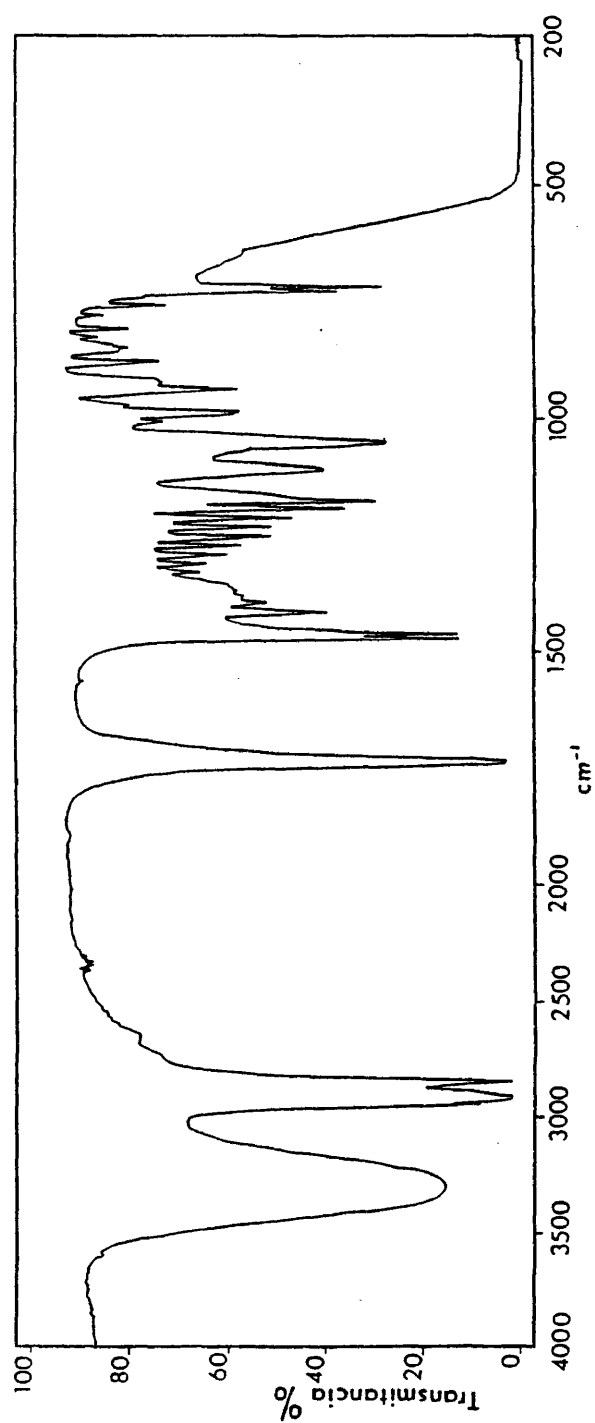


Figura III.23. Espectro infrarrojo (entre placas de NaCl) de un patrón de monoestearina.

TABLA III.20

Comparación de las determinaciones de triglicéridos por gravimetría y por espectrofotometría I.R.

Lote	Gravimetría mg.	I.R. mg.	Error pesada %
Inicial	67,17	64,04	4,88
C-45	80,75	73,56	9,77
OR-45	76,46	72,79	5,04
GT-45	85,62	81,50	5,05
C-70	76,55	77,33	-1,01
OR-70	79,76	77,73	2,61
GT-70	69,46	71,61	-3,01
C-100	70,37	68,32	3,00
OR-100	75,58	77,53	-2,52
GT-100	68,96	72,75	-5,21

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

lote alimentado 45 días con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero (GT-45).

#### III.6.4.4.2 Diglicéridos

En la Tabla III.21 se recogen los resultados obtenidos de la determinación gravimétrica y espectrofotométrica (I.R.) de las muestras procedentes de los distintos lotes. Puede observarse que la medida realizada por gravimetría es siempre superior a la espectrofotométrica llegando, en algunos casos, a valores superiores al 100%.

Las Tablas III.17, III.18 y III.19 muestran los valores alcanzados por los diglicéridos.

En la Tabla III.17 puede observarse que los diglicéridos sólo sobrepasan el 3% del total de lípidos apolares del lote OR-70 (truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna durante 70 días) mientras que en los demás lotes su tasa fluctúa alrededor del 2%.

#### III.6.4.4.3 Monoglicéridos

En la Tabla III.22 se recogen los resultados obtenidos de las determinaciones gravi- y espectrofotométricas (I.R.) de las muestras procedentes de los diferentes lotes. Al igual que en el caso de los diglicéridos la determinación



TABLA III.21

Comparación de las determinaciones de diglicéridos por gravimetría y por espectrofotometría I.R.

Lote	Gravimetría mg.	I.R. mg.	Error pesada %
Inicial	6,53	4,38	49,08
C-45	4,25	3,21	32,39
OR-45	7,17	3,70	93,78
GT-45	5,25	2,52	108,33
C-70	6,77	3,40	99,11
OR-70	8,23	5,33	54,41
GT-70	6,54	4,27	53,16
C-100	4,21	3,25	29,53
OR-100	5,36	3,73	43,70
GT-100	4,27	3,21	33,02

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su alimentación correspondiente.

TABLA III.22

Comparación de las determinaciones de monoglicéridos por gravimetría y por espectrofotometría I.R.

Lote	Gravimetría mg.	I.R. mg.	Error pesada %
Inicial	5,41	2,20	145,91
C-45	3,97	1,83	116,94
OR-45	5,87	2,70	117,40
GT-45	7,52	3,25	131,38
C-70	1,88	0,73	157,53
OR-70	4,28	1,57	173,24
GT-70	5,34	1,93	176,68
C-100	4,92	2,03	142,85
OR-100	5,23	1,87	179,68
GT-100	4,75	1,95	143,59

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

gravimétrica fué siempre sensiblemente mayor que la realizada por espectrofotometría.

Las Tablas III.17, III.18 y III.19 recogen los valores alcanzados por los monoglicéridos de los diferentes lotes. En términos generales puede decirse que la tasa de monoglicéridos de todos los lotes está en torno al 1% del total de lípidos apolares excepto en el lote inicial en donde alcanza el 2,43%.

#### III.6.5 Identificación de la fracción eluida con acetona

La separación de lípidos apolares y polares se efectúa normalmente por el método de McLeod (1962) eluyendo la muestra en una columna de ácido silícico, primero con cloroformo y después con metanol. Con ello se separan los lípidos apolares (con cloroformo) de los polares (con metanol). Vorbeck y Marinetti (1965) introdujeron una fase intermedia consistente en eluir con acetona antes del empleo del metanol. Dichos autores indican que la acetona arrastra sólo los glicolípidos permaneciendo en la columna los fosfolípidos.

En este trabajo se ha utilizado el método de Vorbeck y Marinetti (1965) con el fin de separar los tres tipos de lípidos: neutros, glicolípidos y fosfolípidos. Sin embargo, en nuestras condiciones de trabajo, la acetona no sólo eluyó a los glicolípidos sino también una pequeña proporción de

fosfolípidos como quedó de manifiesto al estudiar esta fracción por cromatografía en capa fina. Realmente el comportamiento de la columna cuando se eluía con acetona era muy irregular, como puede observarse en la Figura III.24. en la que se muestran los diferentes tipos de manchas detectadas por cromatografía en capa fina de silicagel G-60 de los extractos obtenidos eluyendo la columna de ácido silícico/celita (1/1)(p/p) con acetona.

En la Figura III.24 se aprecia que en algunos casos (a) se detectaron dos manchas difusas (1 y 3+4) mediante el uso del reactivo del yodo, pero al pulverizar la placa con el reactivo de azul de molibdeno se observó que la mancha superior (3+4) estaba constituida realmente por dos sustancias, una (4) positiva al yodo y otra (3), incluida en la primera, positiva al reactivo del azul de molibdeno.

La mancha nº1 se identificó como fosfatidilserina por mostrar un R<sub>f</sub> (aproximadamente 0,35) igual al de un patrón de fosfatidilserina y ser positiva a los reactivos de azul de molibdeno y ninhidrina (el R<sub>f</sub> que se cita es sólo aproximado porque este fosfolípido se dispersa en las cromatografías sobre silicagel G-60 dando lugar a una mancha cuya longitud depende de la concentración de la muestra).

La mancha nº3, con un R<sub>f</sub> de 0,90 se comportó igual que un patrón de cardiolipina y de los reactivos específicos, sólo

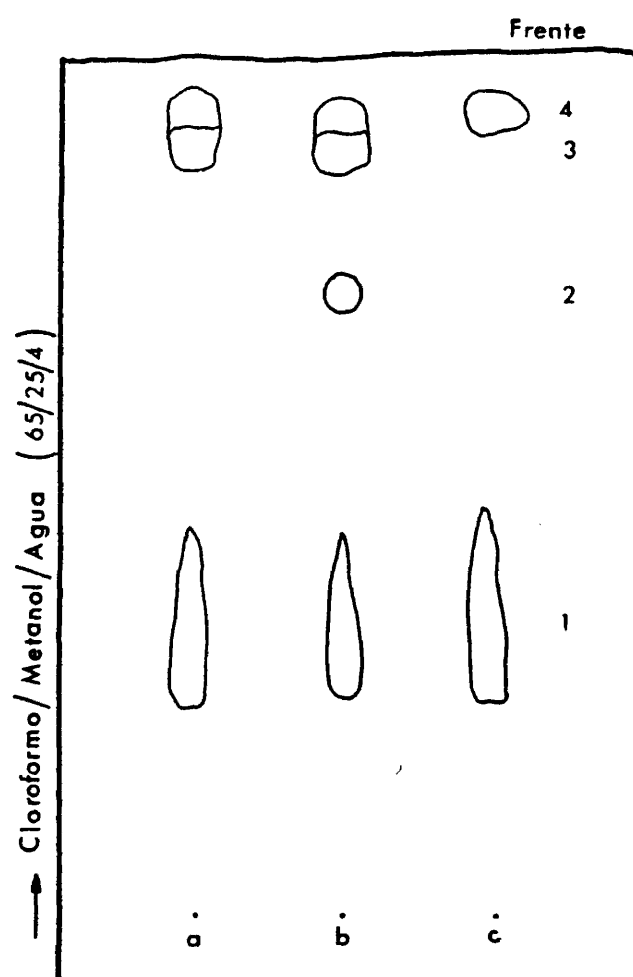


Figura III.24. Cromatografía en capa fina de los diferentes tipos de sustancias obtenidas por elución con acetona de la columna de ácido silícico/celita (1/1)(p/p).  
 1.Fosfatidilserina 2.Fosfatidiletanolamina 3.Cardiolípin 4.No Identificado.

fué positiva al del azul de molibdeno. Se caracterizó, por tanto, como cardiolipina.

La mancha nº4, de Rf 0,92, sólo fué positiva al reactivo general de iodo. No se logró identificar pero es posible se trate de glicolípidos, dado que los lípidos neutros se han separado previamente con cloroformo. Por otra parte, Vorbeck y Marinetti (1965) los eluyen con acetona.

En otros cromatogramas (Fig. III.24.b) se detectaron las manchas anteriores y una adicional, nº2, localizada entre las anteriores; su Rf fué de 0,71 y era positiva al reactivo de ninhidrina y al del azul de molibdeno. Se identificó como fosfatidiletanolamina al comportarse igual que un patrón de dicha sustancia.

Por último, en otros extractos eluidos con acetona sólo se identificaron las manchas 1 y 4 (Fig. III.24.c.), caracterizadas, según se ha descrito anteriormente como fosfatidilserina y probablemente glicolípidos, respectivamente. El comportamiento frente a los diferentes reactivos utilizados de los fosfolípidos detectados en esta fracción y el de los encontrados en la fracción eluida con metanol se muestran en la - Tabla III.23.

Puede concluirse que:

1.- Siempre se eluye fosfatidilserina y la mancha no identificada (probablemente glicolípidos).

TABLA III.23

Comportamiento de cada una de las manchas de la fracción fosfolípidos frente a los reactivos utilizados y sus R<sub>f</sub>s correspondientes.

Mancha	R <sub>f</sub>	I <sub>2</sub>	Azul de molibdeno	Ninhidrina	Schiff	Dragendorff	Identificación
1	0,20	+	+	-	-	+	Lisofosfatidilcolina
2	0,32	+	+	-	-	+	Esfingomielina
3	0,35	+	+	+	-	-	Fosfatidilserina
4	0,47	+	+	-	-	+	Fosfatidilcolina
5	0,77	+	+	+	-	-	Fosfatidiletanolamina
6	0,95	+	+	-	-	-	Cardiolipina

\*Fase móvil: cloroformo / metanol / agua (65/25/4) (v/v/v)

2.- En ocasiones también se eluye sólo cardiolipina o cardiolipina acompañada de fosfatidiletanolamina.

El irregular comportamiento de la columna cromatográfica frente a la acetona queda también reflejado en la Tabla III.11 donde se observan marcadas diferencias, entre las distintas muestras, en la cantidad de lípidos eluidos con acetona cuyos valores extremos oscilan entre 9,14 y 0,88 g/100 g grasa del tejido muscular.

Esta fracción sirvió, no obstante, para determinar el contenido en fosfatidilserina así como para estudiar su composición en ácidos grasos. De no haberse utilizado esta fase intermedia la fosfatidilserina hubiera interferido en la visualización de otros fosfolípidos eluidos con metanol, en particular lisofosfatidilcolina y esfingomielina.

#### III.6.5.1 Comprobación de la presencia de glicolípidos identificados provisionalmente como tales

Con el fin de conocer si la fracción eluida con acetona contenía glicolípidos, alícuotas de dicha fracción se sometieron a una hidrólisis ácida y se cromatografiaron en papel Whatman nº1, de acuerdo con la metodología descrita en II.3.7.6.

Los resultados se muestran en la Figura III.25. En todos los extractos hidrolizados se detectaron tres manchas.



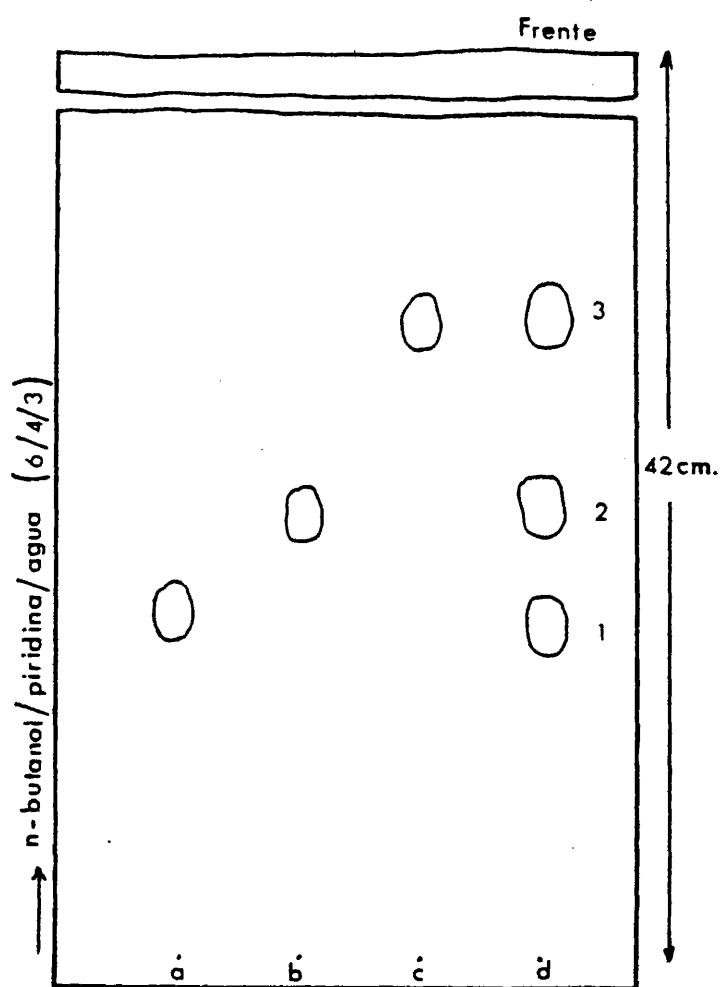


Figura III. 25. Cromatografía en papel Whatman nº1 de las sustancias procedentes de la hidrólisis ácida de la fracción eluida con acetona.  
1. Galactosa 2. Glucosa 3. Glicerol.

La nº1, de Rf 0,23, era positiva al reactivo de Schiff y al del nitrato de plata, al igual que una muestra de galactosa cromatografiada conjuntamente.

La mancha nº2 se comportó de igual forma que la nº1 frente a los reactivos utilizados. Su Rf fué de 0,30, igual al de un patrón de glucosa, caracterizándose como tal.

La mancha nº3, de Rf 0,43, fué sólo positiva al reactivo de Schiff; su Rf, idéntico al de un patrón de glicerol, permitió identificarla como tal.

Puede concluirse que en la fracción eluida con acetona, además de los fosfolípidos detectados en el apartado anterior, existen glicolípidos de cuya composición forman parte la glucosa y/o galactosa. Por tanto, se tratan de ceramidas mono y/o dihexósidos. El glicerol detectado en las cromatografías en papel procede, presumiblemente, de la molécula de los fosfolípidos presentes en la fracción eluida con acetona, aunque también cabría la posibilidad de que procediera de otros lípidos, como glicosilglicéridos.

#### III.6.6 Identificación de la fracción eluida con metanol (fosfolípidos)

Con el fin de identificar los fosfolípidos presentes en el tejido muscular de las truchas, alícuotas de los extractos de lípidos polares obtenidos eluyendo las columnas de ácido

silícico/celita (1/1) (p/p) con metanol se cromatografiaron en capas finas de silicagel G-60 que se desarrollaron con cloroformo-metanol-agua (65/25/4) (v/v/v). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura III.26. Se observa que en todas las muestras se obtuvieron el mismo número de manchas tanto al revelar con el yodo como con el azul de molibdeno.

La mancha n°1 de Rf 0,20 dió reacción negativa frente a los reactivos de Schiff y ninhidrina y positiva a los reactivos de yodo, azul de molibdeno y Dragendorff; se comportó igual que un patrón de lisofosfatidilcolina, fué por tanto identificada como lisofosfatidilcolina.

La mancha n°2 de Rf 0,32 igual que el de un patrón de esfingomielina cromatografiado conjuntamente, dió reacción positiva frente al reactivo de yodo, azul de molibdeno y Dragendorff y negativa al de Schiff; se caracterizó como esfingomielina.

La mancha n°3 dió reacción negativa a los reactivos de Schiff y ninhidrina siendo positiva al de yodo, azul de molibdeno y Dragendorff; su Rf de 0,47 fué similar al de un patrón de fosfatidilcolina, identificándose como tal.

La mancha n°4 de Rf 0,77 resultó positiva frente al reactivo de yodo, azul de molibdeno y ninhidrina, siendo negativa al de Schiff y Dragendorff; se cromatografió con un

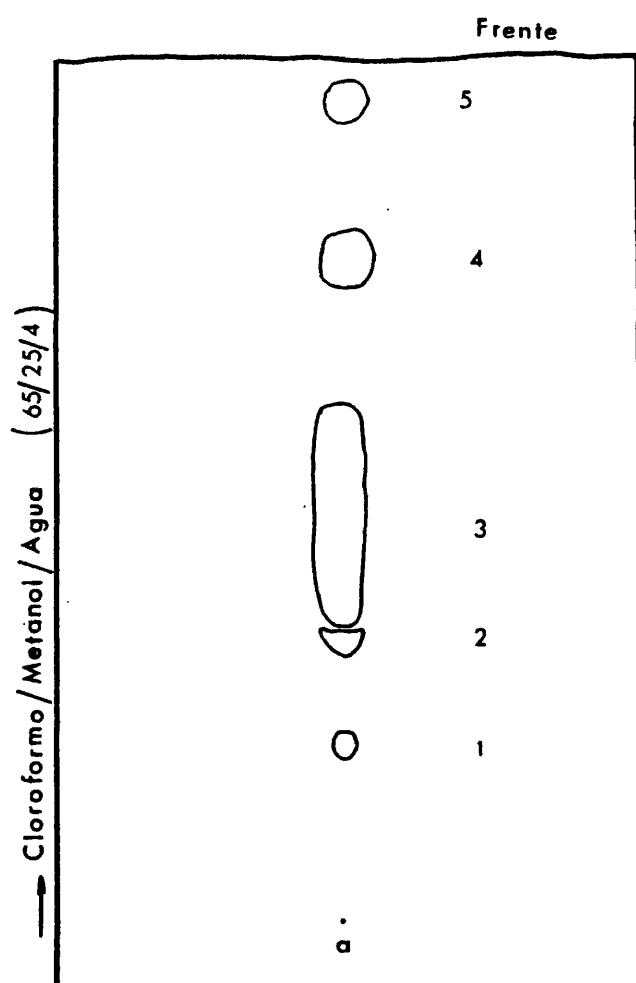


Figura III.26. Cromatografía en capa fina de los lípidos polares eluidos con metanol.

1.Lisofosfatidilcolina 2.Esfingomielina  
3.Fosfatidilcolina 4.Fosfatidiletanolamina 5.Cardiolípidina.

patrón de fosfatidiletanolamina y por presentar el mismo Rf se identificó como tal.

La mancha nº5 de Rf 0,95 sólo era positiva a los reactivos de iodo y azul de molibdeno; se cromatografió con un patrón de cardiolipina que dió el mismo Rf identificándose como tal.

La Tabla III.23 muestra el comportamiento de cada uno de los fosfolípidos frente a los distintos reactivos utilizados.

#### III.6.7 Cuantificación de los fosfolípidos

Teniendo en cuenta el contenido en fósforo, determinado según se describe en II.3.7.8.4, de alícuotas separadas en capa fina preparativa y el peso de la molécula de cada uno de los fosfolípidos se estimó la cantidad de cada uno de ellos en el tejido muscular de las truchas.

Las Tablas III.24, III.25 y III.26 muestran los resultados expresados en g/100g fosfolípidos, mg/g materia grasa total y mg/g extracto seco del tejido muscular, respectivamente.

La fosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante en todos los casos representando más del 50% de la totalidad,

TABLA III.24

Valores alcanzados por los diferentes fosfolípidos identificados (g/100 g fosfolípidos)

Componente	Lote									
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
Lisofosfatidilcolina	3,31	3,34	3,22	3,82	3,33	5,66	4,33	5,11	3,99	3,68
Esfingomielina	5,09	4,62	4,98	8,04	6,40	6,95	5,73	7,12	5,60	6,55
Fosfatidilserina	2,45	1,77	2,28	1,94	1,97	2,26	1,51	1,72	2,59	2,96
Fosfatidilcolina	57,84	55,68	56,76	61,11	53,87	57,71	60,93	52,51	57,97	51,83
Fosfatidiletanolamina	26,58	29,81	27,09	19,42	26,28	20,91	20,28	26,83	23,71	29,42
Cardiolipina	4,71	4,78	5,64	5,65	8,13	6,48	7,25	6,70	6,12	5,55

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

TABLA III.25

Valores alcanzados por los diferentes fosfolípidos identificados (mg/g materia grasa total)

Componente	Inicial	Lote							
		C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100 GT-100
Lisofosfatidilcolina	10,26	14,34	11,10	12,20	12,21	20,13	12,86	14,50	11,61 9,70
Esfingomielina	15,75	19,83	17,15	25,66	23,45	24,71	17,01	20,22	16,30 17,22
Fosfatidilserina	7,50	8,29	8,83	6,38	7,39	8,27	7,50	4,93	7,72 7,79
Fosfatidilcolina	178,96	239,19	195,35	195,06	197,36	204,96	180,90	149,01	168,68 136,30
Fosfatidiletanolamina	82,24	128,07	93,25	62,00	96,27	74,27	60,23	76,14	68,98 77,37
Cardiolipina	14,57	20,55	19,43	18,06	29,80	23,01	21,55	19,02	17,82 14,59

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

TABLA III.26

Valores alcanzados por los diferentes fosfolípidos identificados (mg/g extracto seco del tejido muscular)

Componente	Lote									
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
Lisofosfatidilcolina	1,18	1,48	1,24	1,66	1,30	2,47	1,80	1,78	1,28	1,22
Esfingomielina	1,81	2,04	1,92	3,50	2,50	3,04	2,38	2,50	1,80	2,17
Fosfatidilserina	0,87	0,78	0,88	0,84	0,77	0,99	0,63	0,60	0,83	0,98
Fosfatidilcolina	20,63	24,65	21,90	26,54	21,00	25,21	25,36	18,38	18,57	17,20
Fosfatidiletanolamina	9,48	13,20	10,45	8,44	10,24	9,13	8,44	9,39	7,60	9,76
Cardiolipina	1,68	2,11	2,18	2,45	3,17	2,83	3,02	2,34	1,96	1,84

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.



seguida por la fosfatidiletanolamina, cuyos valores están comprendidos entre 20 y 30%. La concentración de cada uno de los restantes fosfolípidos no llega, en ningún caso, a valores del 10%, siendo la fosfatidilserina el componente minoritario.

### III.6.8 Composición en ácidos grasos de cada una de las fracciones aisladas.

Un estudio conjunto de las Tablas III.18 y III.25 permite afirmar que la suma de triglicéridos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina representa alrededor del 75% del total de la grasa muscular. Por lo tanto, la composición en ácidos grasos de la grasa del tejido muscular de la trucha derivará principalmente de la composición en ácidos grasos de éstas tres fracciones. Por ello, se ha preferido analizar los ácidos grasos de cada fracción siguiendo un orden decreciente respecto de su concentración y haciendo especial hincapié en los tres mayoritarios.

#### III.6.8.1 Ácidos grasos de los triglicéridos

La Tabla III.27 muestra la composición en ácidos grasos de los triglicéridos de la grasa obtenida a partir del tejido muscular de las truchas de los diferentes lotes.

Del estudio de la misma se deduce, en términos generales, que el C-18:1 es siempre el ácido graso mayoritario, con valores comprendidos entre un 44 y un 34%, seguido del C-16 (22-17%) y del C-18:2 (12-10%). Tras éstos, un grupo de ácidos grasos (C-14, C-16:1, C-18:3, C-22:1 y C-22:6) son los que alcanzan los valores más destacados (valor medio entre 2-7%) de los restantes ácidos grasos detectados. Cabe resal-

TABLA III.27

Composición en ácidos grasos de los triglicéridos (% en peso)

L O T E										
Ac. graso	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
C-14	3,33	7,42	6,34	3,35	3,51	2,85	2,70	4,84	2,95	2,97
C-14:1	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N.I.	-	tr	0,05	tr	0,07	-	-	0,12	-	-
N.I.	tr	tr	0,05	tr	0,07	-	-	0,12	-	-
N.I.	0,08	tr	0,68	0,17	0,25	0,23	-	0,58	-	0,29
N.I.	tr	tr	0,17	0,07	0,54	0,26	1,50	0,91	0,98	0,29
C-16	18,12	22,48	16,72	19,45	18,25	17,74	18,14	20,78	19,96	16,96
C-16:1	6,32	8,48	7,67	6,68	7,50	6,88	4,98	7,01	6,40	5,44
C-17	0,10	0,23	tr	0,14	0,27	0,10	0,29	0,25	0,18	tr
N.I.	-	0,29	0,47	0,71	1,01	0,33	0,49	0,56	0,46	0,70
C-18	3,55	4,55	4,63	5,12	4,51	4,63	6,22	4,63	4,43	4,46
C-18:1	39,69	38,44	39,60	44,10	35,60	41,50	43,35	34,63	41,89	43,71
C-18:2	12,06	10,18	12,47	9,95	12,04	12,41	11,06	10,02	11,46	11,65
C-20	0,08	0,17	0,37	0,26	0,33	0,31	0,27	0,29	0,30	0,90
C-18:3	3,62	5,03	3,96	4,27	5,05	4,17	4,48	4,28	5,42	6,32
C-20:1	1,87	1,00	0,52	1,00	1,02	1,03	0,89	0,92	0,37	0,19
C-20:2	1,80	0,42	0,47	0,98	1,10	1,11	1,29	1,07	1,04	1,27
C-20:3	0,38	0,16	0,53	0,37	0,55	0,53	0,49	0,55	0,31	0,41
C-22	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
C-22:1	2,58	1,20	0,94	1,82	2,04	1,94	1,79	2,24	1,60	1,20
N.I.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03
C-22:2	0,23	tr	0,23	0,13	0,25	0,18	tr	0,22	tr	0,02
C-20:5	0,93	-	0,85	0,25	0,90	0,64	0,30	0,85	0,33	0,41
C-24	0,50	-	-	-	0,05	tr	-	0,02	-	0,06
C-24:1	0,46	tr	0,42	0,49	0,64	0,41	0,39	0,62	0,51	0,32
N.I.	-	-	tr	tr	0,18	0,16	0,44	0,20	-	0,07
C-22:5	tr	-	tr	tr	0,41	0,20	-	0,33	tr	0,06
C-22:6	3,30	tr	2,71	0,58	3,74	2,62	0,84	3,84	1,35	2,17

## Indice

Iodo 102,0 77,9 96,6 84,9 104,1 99,0 87,0 96,9 91,5 99,5

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

N.I.: No identificado ; tr: trazas

tar que en algunas muestras los valores de algunos ácidos grasos fueron muy bajos, en especial el C-22:6 en truchas de los lotes C-45, GT-45 y GT-70.

Los demás ácidos grasos en ninguna muestra llegaron al 2%.

La Tabla III.27 muestra también el índice de iodo calculado a partir de los valores reflejados en ella y según se describe en II.3.7.14. La Figura III.27 muestra la evolución del índice de iodo. Puede decirse que el índice de iodo se mantiene estable a lo largo del periodo de experimentación alcanzando valores próximos a 100. El lote alimentado con el pienso comercial fué el que mostró mayores fluctuaciones (Fig. III.27).

La Tabla III.28 muestra la composición en ácidos grasos de los triglicéridos agrupados de acuerdo con su grado de insaturación. En todos los lotes, los ácidos grasos más abundantes fueron los monoenoicos que alcanzaron valores próximos al 50%, seguidos de los saturados con porcentajes máximos del 34%, lo que significa que ambos constituyen más del 75% del total de ácidos grasos. Aproximadamente en el 25% restante destacan en primer lugar los dienoicos cuyos valores están comprendidos entre el 10 y 14% y en segundo los trienoicos (4-6%). Los penta y hexaenoicos sólo representan un pequeño porcentaje (no más del 4%) y muestran

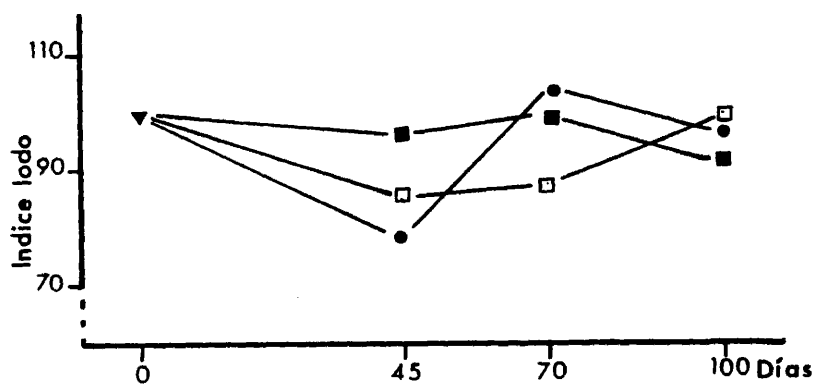


Figura III.27. Evolución del índice de iodo de los triglicéridos del tejido muscular de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado.

▼Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

●Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

TABLA III.28

Composición en ácidos grasos de los triglicéridos según el grado de insaturación (% en peso)

Ac. graso	Inicial	L O T E									
		C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100	GT-100
Saturados	25,68	34,85	28,06	28,18	26,65	25,63	27,62	30,56	27,82	25,35	25,35
Monosenoicos	51,92	49,12	49,15	54,09	46,80	51,76	51,40	45,42	50,77	50,86	50,86
Dienoicos	14,09	10,60	13,17	11,06	13,39	13,40	12,35	11,31	12,50	12,94	12,94
Trienoicos	4,00	5,19	4,49	4,64	5,60	4,70	4,97	4,83	5,73	6,73	6,73
Pentaenoicos	0,93	tr	0,85	0,25	1,31	0,84	0,30	1,18	0,33	0,47	0,47
Hexaenocios	3,30	tr	2,71	0,58	3,74	2,62	0,84	3,84	1,35	2,17	2,17
No Identificados	0,08	0,29	1,42	0,95	2,12	0,98	1,99	2,49	1,44	0,68	0,68

Inicial : lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.  
tr : trazas

amplias fluctuaciones ya que, a veces, el valor de una muestra es unas 6 veces mayor que el obtenido de otra de procedencia distinta. Por ejemplo, en el lote C-100, los hexaenoicos representan el 3,84% del total mientras que en el GT-45 sólo llegan al 0,58%.

#### III.6.8.2 Ácidos grasos de la fosfatidilcolina

En la Tabla III.29 se recoge la composición porcentual de los ácidos grasos de la fosfatidilcolina de la grasa procedente del tejido muscular de los diferentes lotes de truchas.

A diferencia de lo que sucede con los ácidos grasos de los triglicéridos, el C-16 es el ácido graso mayoritario: su porcentaje está comprendido entre un 37 y un 25%; le siguen el C-18:1 y C-22:6 que alcanzan valores similares (próximos al 20%) aunque con fluctuaciones acusadas, sobre todo en el caso del C-22:6 que oscila entre un máximo del 23,52% para el lote OR-45 y un mínimo del 13,87% para el OR-70. En contraste también con los triglicéridos, el C-18:2 es menos abundante en la fosfatidilcolina, representando aproximadamente la mitad del valor hallado en los triglicéridos.

De los restantes ácidos grasos merecen mencionarse aquellos cuyo porcentaje oscila entre 2-7%; este grupo está constituido por el C-14, C-16:1, C-18, C-22:1, y C-20:5.

TABLA III.29

Composición en ácidos grasos de la fosfatidilcolina (% en peso)

L O T E										
Ac.graso	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
C-14	2,27	1,96	2,15	1,68	2,06	1,70	2,42	2,70	1,67	1,44
C-14:1	-	-	-	-	0,23	0,14	0,34	1,74	-	0,12
N.I.	0,60	0,45	0,43	0,26	0,35	0,14	0,45	0,52	0,28	0,24
N.I.	0,24	1,29	1,11	0,13	0,29	0,14	2,07	1,92	1,65	1,15
C-16	25,84	37,17	27,97	30,35	34,97	37,73	28,79	33,33	30,55	35,43
C-16:1	4,27	7,77	6,45	4,92	7,04	8,52	6,91	4,42	3,49	3,37
C-17	0,13	0,17	0,09	0,13	0,23	0,28	0,23	0,45	0,52	0,24
N.I.	0,24	0,26	0,18	0,22	0,32	0,42	0,28	0,52	0,87	0,36
C-18	2,06	2,07	1,14	1,55	1,87	4,05	1,61	2,24	2,30	1,68
C-18:1	16,33	17,10	16,78	18,67	16,82	16,63	19,00	15,41	18,64	18,80
C-18:2	5,79	7,50	7,15	7,03	6,02	5,71	6,35	5,80	4,97	5,78
C-20	1,24	0,08	0,18	0,13	0,22	0,28	0,46	0,41	0,35	0,04
C-18:3	0,43	1,24	0,71	1,54	1,17	1,24	1,49	1,56	0,52	0,60
C-20:1	1,15	0,84	1,29	0,54	0,61	0,59	0,57	0,39	1,39	0,48
C-20:2	1,36	0,20	0,35	0,39	0,47	0,17	0,34	0,46	1,04	0,24
C-20:3	0,48	0,67	0,64	1,09	0,78	0,68	1,03	1,09	0,52	0,78
C-22:1	3,99	1,99	2,51	2,38	2,34	2,63	2,82	2,43	2,79	2,95
C-22:2	0,13	0,13	0,09	tr	0,09	0,07	tr	0,36	tr	tr
C-20:5	4,65	3,67	4,37	4,15	4,13	3,12	4,14	3,75	4,50	3,56
C-24	2,34	tr	0,18	0,39	0,23	0,17	tr	0,31	1,39	tr
C-24:1	2,58	1,03	1,57	0,90	1,42	1,19	1,49	0,52	2,09	1,80
C-22:5	1,51	0,53	1,07	5,99	0,54	0,44	0,69	0,44	1,04	0,60
C-22:6	22,26	14,10	23,52	17,51	17,70	13,87	18,43	19,14	19,34	20,25

Indice

Iodo 168,4 127,9 174,2 166,4 144,0 121,7 152,1 147,6 150,8 149,7

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

N.I.: No Identificado ; tr: trazas



De ellos, el mayoritario es el C-16:1 con valores muy variables comprendidos entre el 3 y 8%. Los restantes, en términos generales, no alcanzan el 2% del total.

En la Figura III.28 y en la Tabla III.29 pueden observarse los índices de iodo de la fosfatidilcolina procedente del tejido muscular de las truchas de cada uno de los lotes. Se aprecian amplias fluctuaciones durante el periodo experimental, pero al final el índice de iodo alcanza un valor similar en los tres lotes, situándose en torno a 150. En comparación con el índice de iodo de los triglicéridos, el de la fosfatidilcolina es significativamente más alto, debido a la mayor riqueza en C-22:6.

La Tabla III.30 muestra la composición en ácidos grasos de la fosfatidilcolina de acuerdo con el grado de insaturación. Los más abundantes son los saturados seguidos de los monoenoicos y de los hexaenoicos que alcanzan tasas del 75 y 50% con respecto a los saturados. En orden de importancia, le siguen los di- y pentaenoicos con valores medios del 4-7%. En último lugar se encuentran los ácidos grasos con tres dobles enlaces que nunca representan el 3% del total.

#### III.6.8.3. Ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina

La Tabla III.31 muestra la composición en ácidos gra

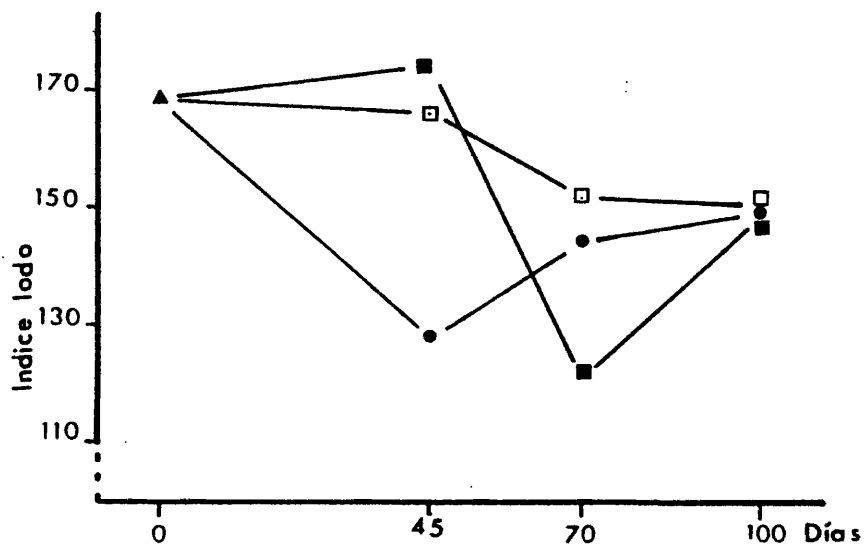


Figura III.28. Evolución del índice de iodo de la fosfatidilcolina del tejido muscular de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado.

▲ Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

● Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■ Lote OR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□ Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero

TABLA III.30

Composición en ácidos grasos de la fosfatidilcolina según el grado de insaturación (% en peso)

Ac. graso	Inicial	L O T E									
		C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100	GT-100
Saturados	33,88	41,45	31,71	34,10	39,58	44,21	33,51	39,44	36,78	38,83	38,83
Monoenoicos	28,32	28,73	28,60	27,41	28,46	29,70	31,13	24,91	28,40	27,52	27,52
Dienuicos	7,28	7,83	7,59	7,42	6,58	5,95	6,69	6,62	6,01	6,02	6,02
Trienuicos	0,91	1,91	1,35	2,63	1,95	1,92	2,52	2,65	1,04	1,38	1,38
Pentenuicos	6,16	4,20	5,44	10,14	4,67	3,56	4,83	4,19	5,54	4,16	4,16
Hexenuicos	22,26	14,10	23,52	17,51	17,70	13,87	18,43	19,14	19,34	20,25	20,25
No Identificados	1,08	2,00	1,72	0,61	0,96	0,70	2,80	2,96	2,80	1,75	1,75

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

ses de la fosfatidiletanolamina de las diferentes muestras analizadas. El C-16, C-18:1 y C-22:6 son los mayoritarios, aunque con grandes fluctuaciones entre los diferentes lotes. Así, el C-16 alcanza un mínimo del 10% en las muestras C-100 y C-70 mientras que el máximo lo alcanza en el GT-45 con un 22%. En el caso del C-18:1 los valores extremos son de un 28% en las muestras GT-45 y del 14% en el C-100. Por último, los valores del C-22:6 están comprendidos entre el 33 y el 16%. En comparación con la fosfatidilcolina, se observa que las tasas de C-16 son significativamente más bajas, mientras que son mayores las de C-22:6.

A estos tres ácidos grasos les siguen en importancia, de acuerdo con su abundancia, el C-18:2 cuyos valores están comprendidos en el intervalo 5-10%. A continuación hay un grupo de ácidos grasos que alcanzan valores comprendidos entre el 2-5%; entre los que cabe mencionar el C-16:1, C-18, C-22:1 y C-20:5.

Los valores del índice de iodo (Tablas III.31) de los ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina fueron los más altos de todas las fracciones lipídicas caracterizadas. Durante el periodo de crecimiento estudiado en las truchas se observa (Fig. III.29) un descenso inicial muy acusado del índice de iodo de los ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina en el lote GT y menos en los otros dos. Tras este descenso inicial, el índice del lote C aumenta progresivamente du

TABLA III.31

Composición en ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina (% en peso)

L O T E										
Ac. graso	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
C-14	0,76	0,72	1,07	1,11	1,35	2,50	0,57	3,98	2,79	-
C-14:1	0,19	0,08	0,06	0,03	-	0,80	-	0,51	-	-
N.I.	0,19	0,20	0,07	0,07	1,41	0,22	-	-	0,72	-
N.I.	0,15	0,68	0,11	0,11	0,38	0,44	0,61	0,43	0,54	0,39
C-16	19,20	18,07	21,81	22,27	10,72	16,75	12,23	9,93	15,80	11,23
C-16:1	3,53	4,13	2,90	3,04	0,90	2,25	1,62	1,13	1,42	2,81
C-17	0,76	0,08	0,18	0,74	1,13	0,27	2,02	0,51	0,72	1,34
N.I.	0,51	0,72	0,22	1,11	0,83	0,48	1,45	0,51	0,72	1,34
C-18	3,68	4,13	3,78	3,71	4,52	3,33	3,66	3,62	4,30	5,62
C-18:1	17,66	18,79	22,26	28,58	19,63	20,49	16,63	13,96	16,52	16,43
N.I.	-	-	-	-	-	-	-	0,28	-	-
C-18:2	9,21	8,51	8,34	9,72	5,46	6,08	5,37	6,20	6,89	6,74
N.I.	-	-	-	-	0,84	-	-	-	-	-
C-20	0,02	0,36	0,07	0,03	0,97	0,10	-	0,61	0,85	4,49
C-18:3	1,84	1,58	0,78	1,48	1,20	-	-	-	-	-
C-20:1	0,61	0,92	0,89	0,37	3,16	1,94	2,76	4,64	1,50	0,10
C-20:2	0,96	1,39	1,18	0,55	0,45	0,73	0,15	0,61	0,20	-
C-20:3	0,61	1,13	0,96	0,89	1,20	0,91	0,90	1,43	1,42	2,02
N.I.	-	-	-	-	-	0,06	tr	-	-	-
C-22	-	-	-	-	0,45	1,39	5,20	1,72	3,44	6,30
N.I.	-	-	-	-	2,41	-	-	-	-	-
C-22:1	2,66	4,25	3,47	2,97	3,25	3,24	9,12	5,78	4,59	7,20
C-22:2	0,38	0,21	0,29	0,14	0,37	0,49	tr	0,25	0,36	tr
C-20:5	3,58	4,47	4,45	2,67	3,48	4,38	2,61	3,10	4,73	3,59
C-24	0,47	0,90	1,06	1,11	1,69	0,33	2,28	1,02	2,29	2,91
C-24:1	0,96	2,94	1,78	1,41	0,90	0,46	10,92	3,10	2,72	8,54
N.I.	-	-	-	-	1,66	1,35	tr	1,55	tr	tr
C-22:5	5,37	1,08	1,33	1,18	1,42	0,93	tr	1,23	tr	tr
C-22:6	26,62	24,55	22,85	16,63	30,14	29,57	21,85	33,80	27,03	20,24
Indice										
Iodo	207,1	188,9	179,2	150,0	201,4	200,1	157,6	215,1	184,8	155,0

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

N.I.: No Identificado ; tr: trazas

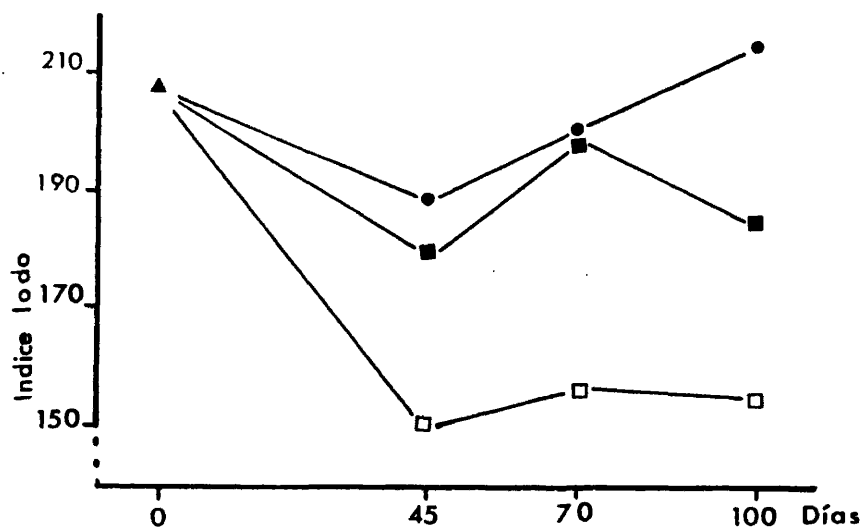


Figura III.29. Evolución del índice de iodo de la fosfatidiletanolamina del tejido muscular de las truchas durante el periodo de crecimiento estudiado.

▲Lote Inicial: común a los tres lotes experimentales

●Lote C: truchas alimentadas con pienso comercial

■Lote DR: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna

□Lote GT: truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero.

rante los restantes días que duró la experiencia; por el contrario, en los otros dos lotes, los índices de iodo finales son similares a los alcanzados tras el descenso inicial.

En relación con el grado de insaturación de los ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina (Tabla III.32) se observa que los porcentajes mayoritarios pertenecen a los monoenoicos o hexaenoicos dependiendo de la muestra; entre ambos representan más del 50% del total de ácidos grasos. Tras éstos, le siguen en importancia los saturados, con valores entre el 20-30% y los dienoicos con el 5-10%. Al igual que en el caso de la fosfatidilcolina, los trienoicos son los ácidos grasos insaturados minoritarios.

#### III.6.8.4 Estudio comparativo de los índices de iodo de los triglicéridos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

Con el fin de comparar los índices de iodo de las tres fracciones mayoritarias, triglicéridos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, se han preparado las Figuras III.30, III.31 y III.32 en las que se representan la evolución de los índices de iodo agrupados según la dieta recibida por cada lote de truchas. En las tres figuras se observa que el índice de iodo de los triglicéridos es el más bajo seguido del de la fosfatidilcolina, salvo en la muestra GT-45 (Fig. III.32). Aunque en todos ellos se aprecian

TABLA III.32

Composición en ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina según el grado de insaturación (en peso)

Ac. graso	L O T E									
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
Saturados	24,89	24,26	27,97	28,97	20,83	25,07	25,96	21,39	30,19	30,55
Monoenoicos	25,61	31,11	31,36	36,39	27,84	29,18	41,05	29,12	26,75	35,08
Dienoicos	10,55	10,11	9,81	10,41	6,28	7,30	5,52	7,06	7,45	6,74
Trienoicos	2,45	2,71	1,74	2,37	2,40	0,91	0,90	1,43	1,42	2,02
Pentaenoicos	8,95	5,55	5,78	3,85	4,90	5,31	2,61	4,33	4,73	3,59
Hexaenoicos	26,62	24,55	22,85	16,63	30,14	29,57	21,85	33,80	27,03	20,24
No Identificados	0,85	1,60	0,40	1,29	4,69	2,55	2,06	2,77	1,98	1,73

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentado con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100 : días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.



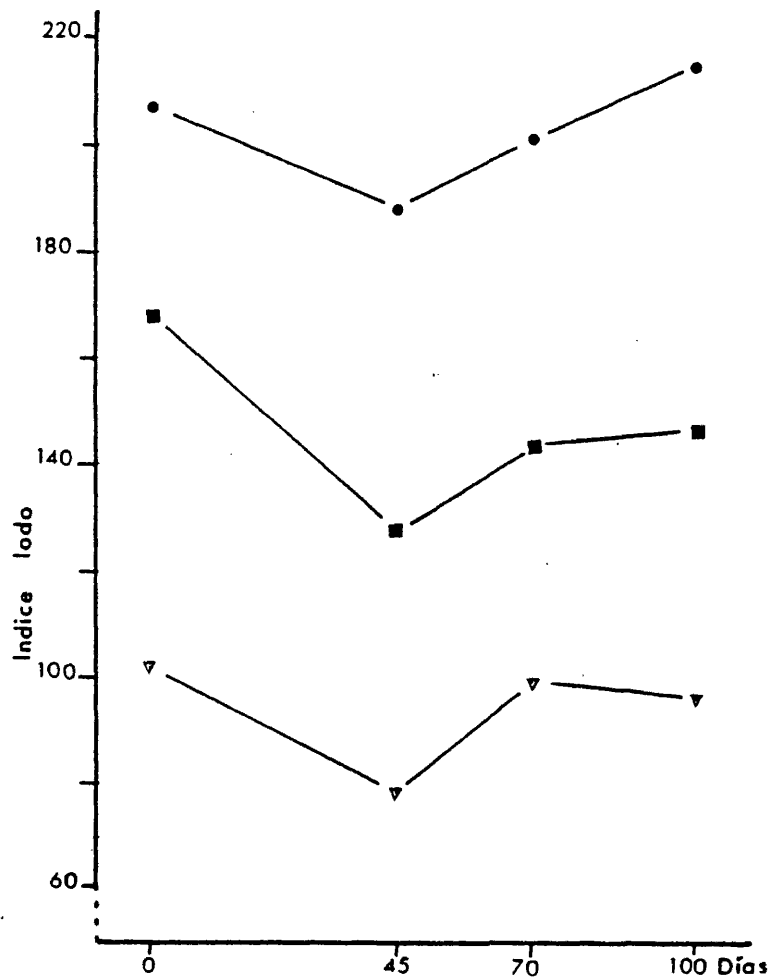


Figura III.30 Evolución del índice de iodo de la fosfatidiletanolamina (●), fosfatidilcolina (■) y de los triglicéridos (▼) procedentes de la grasa del tejido muscular de truchas alimentadas con pienso comercial (Lote C).

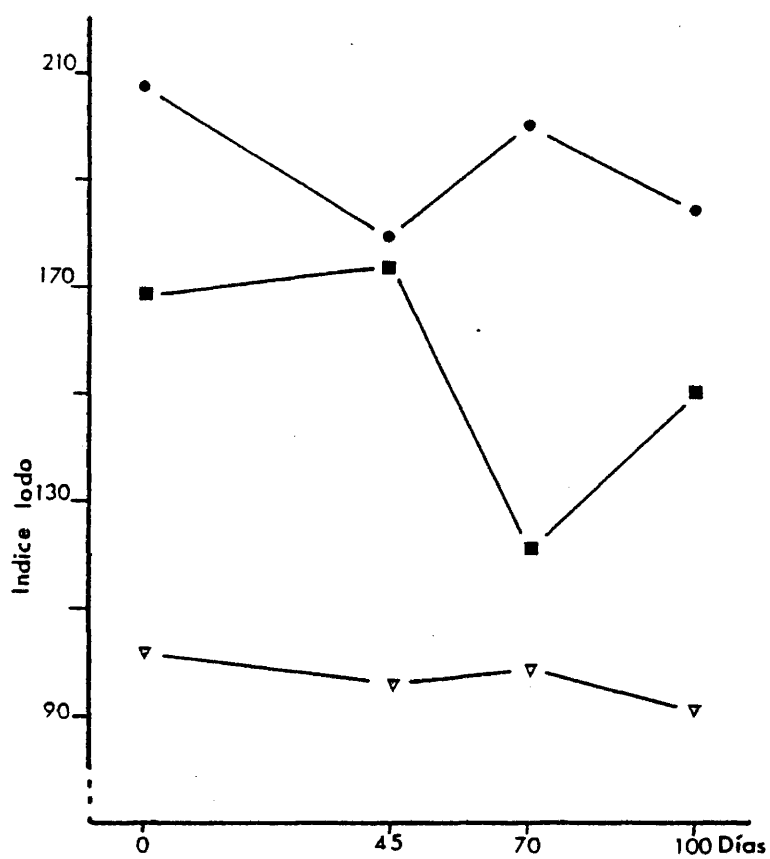


Figura III.31 Evolución del índice de iodo de la fosfatidiletanolamina (●), fosfatidilcolina (■) y de los triplícidos (▼) procedentes de la grasa del tejido muscular de truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna (Lote OR).

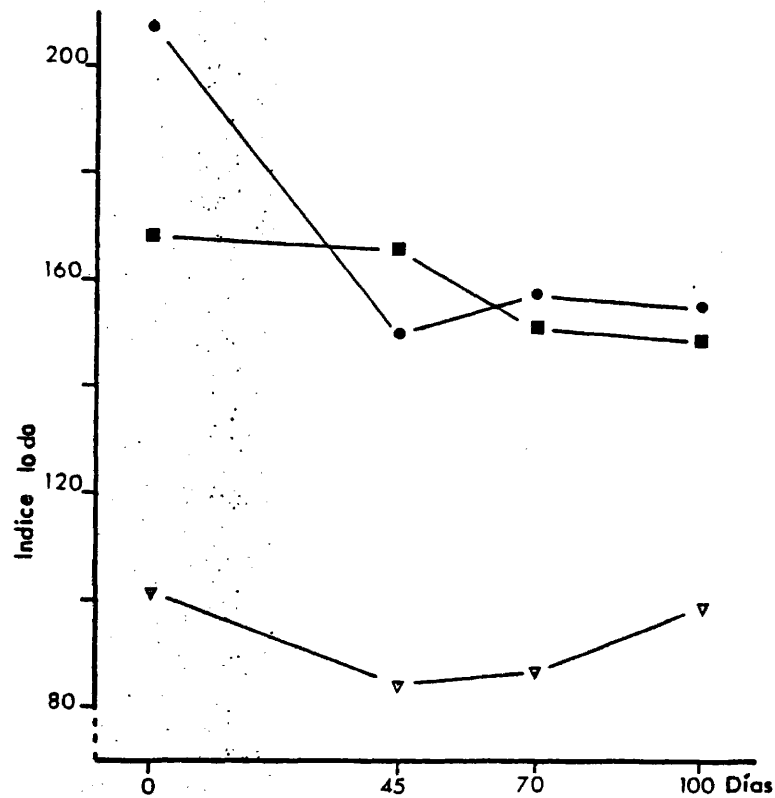


Figura III.32 Evolución del índice de iodo de la fosfatidil-etanolamina (●), fosfatidil-colina (■) y de los triglicéridos (▼) procedentes de la grasa del tejido muscular de truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero (Lote GT).

fluctuaciones, las más acusadas son las del lote OR. Puede afirmarse que en general, el índice de iodo desciende durante los primeros 45 días de alimentación experimental in dependientemente de cual sea la suministrada.

#### III.6.8.5 Ácidos grasos de la cardiolipina

La composición en ácidos grasos de la cardiolipina se muestra en la Tabla III.33 (% en peso) y III.34 (de acuerdo con su grado de insaturación). Los cuatro ácidos grasos mayoritarios son el C-16, C-18:1, C-18:2 y C-22:6, que representan conjuntamente entre el 45 y 65% del total de áci dos grasos, salvo en el C-45 que llega al 70%. El C-14 y C-20:3 son los que le siguen en abundancia.

Cabe resaltar, además, la heterogeneidad en los valores alcanzados en las diferentes muestras, mereciendo especial mención : 1º) el bajo porcentaje alcanzado por el C-16:1 en la muestra C-70, al igual que el C-18:3 en la muestra C-45; el C-20:3 en la muestra Inicial y la C-45 y, el C-20:5 en las GT-70 y OR-100. 2º) El alto valor alcanzado por el C-20:3 y C-22 de la muestra OR-45, en relación con los restantes, al igual que el C-22 de la muestra OR-100 y el C-24 de la GT-45. 3º) La amplia fluctuación del C-14 y C-22:2 al comparar todas las muestras conjuntamente. 4º) La presencia de un ácido graso no identificado (N.I.), con un tiempo de retención superior al del C-22 que, en

TABLA III.33

Composición en ácidos grasos de la cardiolipina (% en peso)

L O T E										
Ac.graso	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
C-10	0,87	-	2,60	-	-	-	-	-	-	-
C-14	3,62	3,76	4,66	1,74	8,33	6,59	2,69	9,46	7,98	5,72
C-14:1	1,53	0,92	1,09	1,30	0,64	1,23	0,50	1,62	0,86	0,83
N.I.	0,23	0,03	0,45	0,34	0,51	0,35	1,34	0,44	0,72	0,26
N.I.	0,69	0,23	0,50	0,46	0,56	0,45	2,35	0,64	0,57	0,32
C-16	17,20	14,89	9,69	10,46	14,39	16,15	22,03	11,98	12,66	7,54
C-16:1	3,72	3,65	1,55	3,77	0,17	2,63	4,20	2,26	0,86	1,10
C-17	0,09	0,07	0,73	0,05	0,02	0,16	0,25	0,24	0,36	0,32
N.I.	0,93	0,15	1,37	1,16	0,25	0,66	0,33	0,49	0,54	0,65
C-18	4,27	4,29	2,47	3,60	6,69	2,06	8,83	6,70	2,30	3,94
C-18:1	24,83	20,12	13,94	16,85	22,90	21,26	18,92	17,87	14,74	14,40
C-18:2	10,32	12,41	4,80	8,13	9,84	12,11	8,57	6,16	8,84	6,10
C-20	0,55	tr	0,91	0,69	0,51	0,82	0,50	0,86	0,36	0,32
C-18:3	3,02	0,69	3,84	3,48	2,55	3,09	1,34	3,45	2,80	2,99
C-20:1	0,74	1,53	0,64	1,16	0,92	1,15	0,84	0,66	1,29	0,65
C-20:2	0,69	0,61	0,36	0,58	1,33	1,36	0,50	0,74	0,71	0,82
C-20:3	0,09	0,53	12,34	6,91	5,01	4,61	3,19	9,46	9,71	8,74
C-22	1,67	3,06	9,60	5,29	1,84	1,44	3,02	3,10	7,19	5,92
N.I.	0,83	3,22	2,47	2,44	2,14	1,48	1,68	1,48	4,67	3,15
C-22:1	3,11	3,25	1,60	2,96	1,73	1,40	1,85	2,76	5,39	5,59
C-22:2	1,16	0,92	4,52	2,90	3,06	0,31	tr	1,97	5,18	5,32
C-20:5	3,74	1,64	1,64	2,32	2,86	2,80	0,33	2,19	0,36	1,71
C-24	0,93	tr	1,46	4,41	0,40	0,24	1,17	0,78	0,72	2,20
C-24:1	0,55	tr	0,34	0,34	0,20	0,20	0,50	0,24	tr	0,49
N.I.	0,96	0,38	0,57	0,69	1,07	0,53	2,35	0,49	0,03	1,18
C-22:5	1,11	0,46	0,22	0,40	0,51	0,49	0,50	0,54	0,28	1,15
C-22:6	11,60	22,99	15,52	17,43	10,63	16,32	12,11	13,31	10,79	18,46
Indice										
Iodo	134,8	169,7	154,1	162,5	130,9	159,0	111,5	144,1	129,5	167,5

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado con orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

N.I.: No Identificado ; tr: trazas

TABLA III.34

Composición en ácidos grasos de la cardiolipina según el grado de insaturación (% en peso)

Ac. graso	L O T E									
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
Saturados	29,20	26,07	32,12	26,24	32,18	27,46	38,49	33,12	31,57	25,96
Monoenoicos	34,48	29,47	19,16	26,38	26,56	27,87	26,81	25,41	23,14	23,06
Dienuicos	12,17	13,94	9,68	11,61	14,23	13,78	9,07	8,87	14,73	12,24
Trienuicos	3,11	1,22	16,18	10,39	7,56	7,70	4,53	12,91	12,51	11,73
Pentaenuicos	4,85	2,10	1,86	2,72	3,37	3,29	0,83	2,73	0,64	2,86
Hexaenuicos	11,60	22,99	15,52	17,43	10,63	16,32	12,11	13,31	10,79	18,46
No Identificados	3,64	4,01	5,36	5,09	4,53	3,47	8,05	3,54	5,53	5,56

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial o pienso comercial adicionado con orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

algunos casos, alcanza un valor cercano al 5%.

Esta amplia diversidad queda igualmente reflejada en el índice de iodo y en el porcentaje de ácidos grasos agrupados según el grado de insaturación (Tabla III.34), siendo los saturados o monoenoicos los mayoritarios y los dienoicos o hexaenoicos los que siguen en abundancia.

#### III.6.8.6 Ácidos grasos de la esfingomielina

Las Tablas III.35 y III.36 muestran la composición en ácidos grasos de la esfingomielina respecto del total de ácidos grasos y con su grado de insaturación, respectivamente. Los cuatro ácidos mayoritarios, al igual que en el caso de la cardiolipina, son el C-16, C-18:1, C-18:2 y C-22:6, alcanzando conjuntamente un valor netamente más alto, superior al 70%.

Al comparar las diferentes muestras entre sí cabe destacar, en términos globales, lo siguiente: 1º) La amplia variación encontrada en los valores del C-16 que alcanza un valor máximo del 37% en la muestra GT-45 y uno mínimo (18%) en la C-45. 2º) Se observa igualmente una gran variación en los C-18, C-22:1 y C-22:6. 3º) La gran estabilidad de los valores alcanzados por el C-18:1 (entre el 22 y 26%) 4º) El valor tan bajo del C-16 de la muestra C-45 y 5º) los valores tan altos alcanzados por el C-16:1 de las muestras

TABLA III.35

Composición en ácidos grasos de la esfingomielina (% en peso)

L O T E										
Ac.graso	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
C-14	2,53	1,26	3,39	2,58	2,13	1,86	2,84	2,36	1,72	1,05
N.I.	1,12	1,44	0,75	1,19	0,42	0,79	0,67	0,37	0,33	0,70
C-16	31,72	18,11	31,54	37,22	30,53	21,33	25,48	23,23	35,57	24,80
C-16:1	6,52	3,62	11,30	12,90	9,25	1,99	3,74	3,40	4,60	3,51
C-17	0,45	0,48	0,47	0,39	0,71	0,13	0,07	0,09	tr	0,17
N.I.	0,56	0,60	0,94	0,49	0,99	0,40	0,29	0,28	tr	0,52
C-18	7,31	24,09	8,49	8,83	15,44	18,13	16,14	22,19	17,05	20,84
C-18:1	24,57	26,20	23,13	22,23	23,48	24,26	23,38	22,85	22,56	25,06
C-18:2	9,16	6,52	9,06	7,14	5,97	7,86	7,19	7,55	4,49	4,83
C-20	tr	tr	tr	tr	tr	0,26	0,45	tr	tr	tr
C-18:3	2,36	2,53	1,41	1,19	1,42	2,13	1,20	1,51	tr	1,05
C-20:1	0,50	0,36	0,18	0,19	tr	2,66	0,52	0,47	0,46	0,08
C-20:2	0,33	0,72	0,28	0,29	0,42	0,53	0,22	0,37	0,57	1,23
C-20:3	0,11	0,60	0,47	0,34	0,07	tr	0,82	-	0,51	1,05
C-22	2,81	0,96	tr	0,29	0,07	0,53	2,69	0,56	0,11	0,70
C-22:1	0,90	3,26	2,36	0,69	2,99	1,86	1,42	3,68	0,46	5,01
C-20:5	0,67	1,08	0,89	0,29	0,64	1,59	1,42	1,13	tr	2,46
C-24	0,22	0,84	0,75	0,09	0,07	2,13	1,04	0,75	0,23	0,88
C-24:1	tr	tr	0,23	tr	tr	2,39	0,45	0,18	1,75	0,70
C-22:6	8,09	7,24	4,25	3,57	5,33	9,06	9,22	8,97	9,44	5,27
Indice										
lodo	93,81	89,37	79,44	68,77	75,40	98,59	93,92	91,91	80,78	81,31

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

N.I.: No Identificado ; tr: trazas



TABLA III.36

Composición en ácidos grasos de la esfingomielina según el grado de insaturación (% en peso)

Ac. graso	L O T E									
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
Saturados	44,82	45,74	44,64	49,40	48,95	44,37	48,71	49,09	54,68	48,44
Monocenoicos	32,49	33,44	37,20	36,01	35,72	33,15	29,51	30,58	29,83	34,36
Dienoicos	9,49	7,24	9,34	7,43	6,39	8,39	7,41	7,92	5,06	6,06
Trienoicos	2,47	3,13	1,88	1,53	1,49	2,13	2,02	1,51	0,51	2,10
Pentaenoicos	0,67	1,08	0,89	0,29	0,64	1,59	1,42	1,13	tr	2,46
Hexaenoicos	8,09	7,24	4,25	3,57	5,33	9,06	9,22	8,97	9,44	5,27
No Identificados	1,68	2,04	1,69	1,68	1,42	1,19	0,96	0,65	0,33	1,22

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial o pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

OR-45 y GT-45; por el C-20:1, C-24 y C-24:1 de la muestra OR-70 y también el valor del C-22 de la muestra Inicial y GT-70.

Las amplias variaciones observadas en los ácidos grasos recogidos en la Tabla III.35, no son tan evidentes al examinarlos de acuerdo con su grado de insaturación (Tabla III.36) ya que se aprecia claramente que los saturados son los mayoritarios seguidos de los monoenoicos.

#### III.6.8.7 Acidos grasos de los diglicéridos

En la Tabla III.37 se muestra el porcentaje de ácidos grasos de los diglicéridos respecto del total de ácidos grasos y en la III.38 se agrupan de acuerdo con el grado de insaturación. El C-18:1 es siempre el más abundante. En los diglicéridos la suma de los porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios (C-16, C-18:1, C-18:2 y C-22:6) es muy variable (de un 47 a un 74%). Igualmente se observan unas diferencias muy amplias al comparar los resultados obtenidos con las diferentes muestras. Hay que destacar como más llamativo, las amplias diferencias observadas en todos los ácidos grasos, incluso en los más abundantes como por ejemplo, las tasas alcanzadas por los C-16:1, C-18:1, C-18:2 y C-22:6, que en algunos casos (C-22:6) están comprendidas entre trazas para las muestras OR-70 y OR-100 y el 16% en el lote C-70.

TABLA III.37

Composición en ácidos grasos de los diglicéridos (% en peso)

Ac.graso Inicial	L O T E									
	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100	
C-8	4,83	2,95	1,83	2,62	-	-	1,07	1,26	-	5,56
C-10	-	-	-	-	-	-	1,76	2,89	4,53	1,21
C-12	-	-	-	-	-	-	0,52	0,98	-	-
C-14	3,14	0,55	2,57	2,33	2,58	3,16	1,55	4,29	3,90	2,26
C-14:1	-	-	-	-	-	-	1,34	1,92	4,03	-
N.I.	0,69	0,40	0,50	0,38	0,41	0,52	0,62	0,44	0,52	0,54
C-16	11,93	4,88	10,65	15,25	9,29	19,14	9,76	14,22	21,42	16,77
C-16:1	7,67	3,07	7,32	6,86	7,26	10,28	3,78	6,61	7,56	5,75
C-17	0,25	0,33	0,25	0,16	0,39	0,07	0,36	0,54	0,37	0,23
N.I.	-	0,36	0,55	0,49	0,53	0,31	0,29	0,40	0,44	0,40
C-18	4,21	5,63	3,16	3,04	4,89	4,35	2,64	3,30	4,78	4,29
C-18:1	32,64	50,42	39,91	35,25	32,24	48,41	21,99	25,22	43,50	39,42
N.I.	-	-	-	-	-	0,31	-	-	0,12	-
C-18:2	9,50	12,84	10,40	9,33	11,07	6,95	6,21	5,10	2,64	8,50
C-20	0,31	0,21	0,30	0,47	0,71	0,31	0,04	0,05	tr	0,11
C-18:3	3,55	2,32	3,88	3,32	4,02	4,11	2,88	3,41	2,13	3,56
C-20:1	1,40	0,43	0,62	0,95	0,87	1,58	2,15	1,48	1,13	1,32
C-20:2	1,06	1,47	0,82	1,28	0,87	0,31	2,00	1,37	1,37	1,45
C-20:3	0,55	0,40	0,68	0,85	0,92	tr	0,36	0,07	-	0,47
C-22:1	2,63	1,92	4,87	3,09	0,87	0,15	1,28	1,48	tr	1,57
N.I.	tr	-	0,14	-	-	-	-	-	-	-
C-22:2	1,42	2,07	0,52	0,73	0,87	-	4,05	4,21	1,51	1,45
N.I.	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-
C-20:5	1,57	1,17	1,08	1,35	1,10	-	2,15	0,82	-	0,47
C-24	-	-	0,62	0,28	-	-	-	-	-	0,40
C-24:1	1,21	1,84	0,66	1,18	0,65	-	4,20	11,02	tr	1,41
N.I.	0,25	-	-	-	0,65	-	-	-	-	-
N.I.	0,22	0,73	tr	tr	0,87	-	4,02	tr	-	-
N.I.	0,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-22:5	0,38	tr	tr	tr	1,10	-	8,43	3,75	-	-
N.I.	-	-	-	-	-	-	2,02	tr	-	-
C-22:6	9,73	5,92	8,60	10,71	15,93	tr	9,51	2,89	tr	1,94
N.I.	0,12	-	-	-	-	-	4,48	2,20	-	0,40
N.I.	0,38	-	-	-	-	-	-	-	-	0,47
Indice										
Iodo	126,2	119,8	125,4	129,0	156,7	79,4	145,5	99,9	67,1	86,2

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente  
N.I.: No Identificado; tr: trazas

TABLA III.38

Composición en ácidos grasos de los diglicéridos según el grado de insaturación (% en peso)

Ao. graso	L O T E									
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	G-100	OR-100	GT-100
Saturados	24,67	14,55	19,38	24,49	17,86	26,96	17,70	27,53	35,00	30,77
Monoenoicos	45,55	57,68	53,38	47,33	41,89	60,42	34,74	47,73	56,22	49,47
Dienoicos	11,98	16,38	11,74	11,34	12,81	7,26	12,26	10,68	5,52	11,40
Trienoicos	4,10	2,72	4,56	4,17	4,94	4,11	3,24	3,48	2,13	4,03
Pentaenoicos	1,95	1,17	1,08	1,35	2,20	-	10,58	4,57	-	0,47
Hexaenoicos	9,73	5,92	8,60	10,71	15,93	tr	9,51	2,89	tr	1,94
No Identificados	1,92	1,49	1,19	0,87	2,46	1,14	11,43	3,04	1,08	1,81

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.  
tr: trazas

Entre otras cosas destacables, debe señalarse también que el C-24:1, ácido graso normalmente escaso en todas las fracciones analizadas, alcanza en la muestra C-100 un valor del 11%. Igualmente destaca la gran abundancia de C-22:5 en las muestras GT-70 y C-100, lo que contrasta con el resto en las que no se detectan o sólo aparecen en cantidades traza. Por último, conviene apuntar la presencia en algunas muestras de dos ácidos grasos no identificados, cuyos tiempos de retención son mayores que los del C-22:6 y que sólo se han detectado en fracción diglicéridos y, como se verá más adelante, en los monoglicéridos. El primero de estos dos ácidos grasos llega a alcanzar hasta más de un 4% en la muestra GT-70.

De la Tabla III.38 se desprende que los monoenoicos son siempre los más abundantes y contribuyen con el 50%, aproximadamente, del total. Les siguen en orden de importancia los saturados (14-35%) y los di- y hexaenoicos, ambos con tasas comprendidas entre el 5 y el 16%.

#### III.6.8.8 Ácidos grasos de la fracción ácidos grasos libres

En las Tablas III.39 y III.40 se muestran, respectivamente, la composición en ácidos grasos de la fracción ácidos grasos libres en relación con el total de ácidos grasos y agrupados por el grado de insaturación.

En esta fracción, los ácidos grasos de cada una de las

TABLA III.39

Composición en ácidos grasos de la fracción ácidos grasos libres (% en peso)

L O T E										
Ac.graso	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
C-14	3,56	3,12	3,27	2,82	3,47	3,96	4,23	2,44	2,37	3,08
C-14:1	0,15	0,10	0,17	0,09	0,14	0,12	0,08	0,12	0,12	0,08
N.I.	0,44	0,31	0,34	0,28	0,29	0,32	0,50	0,35	0,43	0,40
N.I.	0,49	0,42	0,52	0,39	0,50	0,47	0,44	0,36	0,36	0,51
C-16	21,31	23,65	21,44	22,57	23,66	19,51	27,16	20,63	26,28	26,43
C-16:1	7,85	7,30	8,10	7,51	7,47	9,32	7,38	6,24	7,30	7,00
N.I.	0,89	0,42	0,69	0,75	0,71	1,37	0,88	0,54	0,48	0,85
C-18	4,04	4,62	5,80	4,55	5,48	4,82	5,16	5,43	5,47	4,01
C-18:1	32,31	32,87	33,47	33,68	28,46	30,46	35,14	30,68	28,47	30,81
C-18:2	12,06	13,57	15,16	14,79	12,00	13,77	10,74	11,94	10,58	12,39
C-20	0,53	0,45	0,39	0,50	0,26	1,28	0,38	1,64	0,73	0,92
C-18:3	2,91	3,27	2,39	3,08	3,11	3,87	3,11	3,25	2,85	3,06
C-20:1	0,76	0,61	0,48	0,54	0,59	0,68	0,28	0,54	0,56	0,51
C-20:2	0,78	0,83	0,63	0,87	0,89	0,99	0,88	0,81	1,10	0,83
C-20:3	1,07	1,22	1,12	1,21	1,30	1,89	0,56	3,23	1,92	1,13
C-22	tr	tr	tr	tr	1,12	tr	tr	tr	tr	tr
C-22:1	1,94	1,70	1,34	1,48	2,65	0,74	1,12	2,60	2,53	1,82
C-22:2	0,16	-	0,83	0,54	tr	1,80	tr	0,39	0,17	0,40
N.I.	-	-	-	-	-	-	0,13	-	-	-
C-20:5	2,28	1,75	1,07	1,51	1,66	0,08	0,53	2,01	1,98	1,82
C-24	0,13	-	0,03	0,06	0,17	0,08	tr	0,10	tr	0,08
C-24:1	0,36	0,23	0,21	0,26	0,44	0,25	tr	0,25	0,29	0,14
N.I.	0,31	-	0,04	0,15	0,29	0,05	tr	0,81	0,39	0,19
C-22:5	0,22	0,21	0,07	0,11	0,26	0,14	tr	0,43	0,36	0,29
C-22:6	5,34	3,27	2,33	2,63	4,98	3,92	1,22	5,10	5,18	3,18
Indice										
Iodo	108,4	100,0	94,4	98,9	101,9	101,6	78,7	110,6	103,0	95,6

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

N.I.: No Identificado ; tr: trazas

TABLA III.40

Composición en ácidos grasos de la fracción ácidos grasos libres según el grado de insaturación (% en peso)

Ad. graso	L O T E									
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
Saturados	29,57	31,84	30,93	30,50	34,16	29,65	36,93	30,24	34,85	34,52
Monoenoicos	43,37	42,81	43,66	43,56	39,75	41,57	44,00	40,43	39,27	40,35
Dienoicos	13,00	14,40	16,62	16,20	12,89	16,56	11,62	13,14	11,85	13,62
Trienoicos	3,98	4,49	3,51	4,29	4,41	5,76	3,67	6,48	4,77	4,19
Pentaenoicos	2,50	1,96	1,14	1,62	1,92	0,22	0,53	2,44	2,34	2,11
Hexaenoicos	5,34	3,27	2,33	2,63	4,98	3,92	1,22	5,10	5,18	3,18
No Identificados	2,13	1,15	1,59	1,57	1,79	2,21	1,95	2,06	1,66	1,95

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

muestras, no ofrecen diferencias destacables; el ácido graso más abundante es siempre el C-18:1 con valores en torno al 30%, seguido del C-16 (20-25%) y del C-18:2 (11-15%). La suma de los mayoritarios (los anteriores más el C-22:6) se aproxima en todos los casos al 70%.

Al comparar las muestras entre sí se observa también un gran paralelismo; si algo hay que destacar es posiblemente la baja tasa de C-22:6 encontrada en la muestra GT-70.

De la Tabla III.40 se desprende que los monoenoicos son los más abundantes (40-45%) seguidos, en orden de abundancia, de los saturados (30-35%) y los dienoicos (12-16%).

#### III.6.8.9 Ácidos grasos de la lisofosfatidilcolina

La Tabla III.41 muestra la composición en ácidos grasos de la lisofosfatidilcolina (% en peso) y la III.42 agrupa los ácidos grasos de acuerdo con su grado de insaturación.

El ácido graso mayoritario de la lisofosfatidilcolina, al igual que el de la fosfatidilcolina, es el C-16. Se observa también un amplio porcentaje de C-18. Estos dos ácidos grasos más el C-18:1 y el C-22:6 dan cuenta de más del 80% del total. En relación con otras fracciones se observa un gran descenso del C-22:6. Puede decirse, al igual que en el caso de los ácidos grasos libres, que la composición en ácidos grasos de todas las muestras es muy similar observándose



TABLA III.41

Composición en ácidos grasos de la lisofosfatidilcolina (% en peso)

L O T E										
Ac. graso	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
C-14	1,31	1,24	1,81	1,33	1,13	1,36	1,95	2,09	1,88	1,67
N.I.	0,55	0,20	0,90	0,11	0,38	0,62	0,32	0,69	0,72	0,27
C-16	36,81	32,36	34,78	33,23	37,68	34,55	28,72	34,03	35,51	31,73
C-16:1	4,70	5,39	5,79	6,47	7,20	5,02	5,22	4,88	5,37	5,85
C-17	0,13	0,20	0,18	0,17	0,28	0,21	0,13	0,14	0,14	0,27
N.I.	0,27	0,82	0,54	0,34	0,38	0,62	0,26	0,27	0,29	0,50
C-18	13,49	17,01	13,04	12,26	7,40	11,10	12,56	11,50	6,53	14,10
C-18:1	29,90	23,65	23,55	24,56	29,16	25,13	26,11	23,84	21,42	24,36
C-18:2	6,22	5,60	6,70	6,32	9,38	12,56	8,22	5,57	7,62	6,30
C-20	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
C-18:3	1,38	1,86	1,08	2,75	0,90	0,83	1,30	2,51	2,03	2,48
C-20:1	0,13	tr	0,18	0,20	tr	0,21	0,13	0,41	tr	0,19
C-20:2	0,55	0,20	0,36	0,43	0,57	0,31	0,39	1,11	0,07	0,43
C-20:3	0,27	0,62	0,72	0,37	0,47	0,62	0,84	1,25	0,65	0,67
C-22:1	0,48	3,32	2,90	3,08	0,75	1,15	2,08	2,51	2,17	2,73
C-20:5	1,38	1,66	1,08	1,78	0,47	0,10	0,78	0,97	1,16	0,94
C-24	-	-	tr	tr	2,37	0,31	0,52	0,62	0,72	0,23
C-24:1	0,70	2,49	3,62	1,15	tr	0,21	0,65	1,67	0,58	0,70
C-22:5	-	-	-	-	-	-	-	-	4,35	-
C-22:6	1,66	3,32	2,71	4,71	1,42	5,02	9,79	5,85	8,71	6,23
Indice										
Iodo	62,58	70,27	66,31	88,83	64,03	79,50	100,59	82,71	109,64	83,78

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnicas de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

N.I. : No Identificado ; tr: trazas

TABLA III.42

Composición en ácidos grasos de la lisofosfatidilcolina según el grado de insaturación (% en peso)

Ac. grasos	Inicial	L O T E									
		C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100	
Saturados	51,74	50,81	49,81	46,99	48,86	47,53	43,88	48,38	44,78	48,00	
Monoenoicos	35,91	34,85	36,04	35,46	37,11	31,72	34,19	33,31	29,54	33,83	
Dienoicos	6,77	5,80	7,06	6,75	9,95	12,87	8,61	6,68	7,69	6,73	
Trienoicos	1,65	2,48	1,80	3,12	1,37	1,45	2,14	3,76	2,68	3,15	
Pentaeenoicos	1,38	1,66	1,08	1,78	0,47	0,10	0,78	0,97	5,51	0,94	
Hexaeenoicos	1,66	3,32	2,71	4,71	1,42	5,02	9,79	5,85	8,71	6,23	
No Identificados	0,82	1,02	1,44	0,55	0,76	1,24	0,58	0,96	1,01	0,77	

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado

de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

raramente alguna variación significativa, a excepción de las encontradas en el C-22:6 cuyos valores están comprendidos entre el 1,42% (C-70) y el 9,79% (GT-70). La Tabla III.42 permite concluir que al igual que en la fosfatidilcolina y esfingomielina los ácidos saturados son los más abundantes, alcanzando valores próximos al 50%. A éstos, les siguen en abundancia los monoenoicos (30-37%) y dienoicos (6-13%).

#### III.6.8.10 Ácidos grasos de los monoglicéridos

Las Tablas III.43 y III.44 muestran la composición en ácidos grasos de los monoglicéridos en términos de porcentaje en peso de cada ácido graso o agrupados según grado de insaturación, respectivamente.

Hay que resaltar que, al igual que ocurre en los diglicéridos, los ácidos grasos de la fracción monoglicéridos ofrecen una gran diversidad, variando la suma de los mayoritarios (C-16, C-16:1, C-18:1, C-18:2 y C-22:6) entre el 67 y 85%. En cualquier caso, lo mismo que en los monoglicéridos, el mayoritario es el C-18:1 con valores extremos del 28,6% en la muestra GT-100 y 48,5% en la GT-70.

Como en los diglicéridos se han detectado, aunque sólo en dos muestras (C-45 y OR-45), dos ácidos grasos que no se identificaron, cuyos tiempos de retención eran mayores que los del C-22:6.

TABLA III.43

Composición en ácidos grasos de los monoglicéridos (% en peso)

L O T E										
Ac. graso Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100	
C-8	5,76	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-12	-	1,52	-	-	-	-	-	0,60	3,46	
C-14	1,49	1,27	1,18	0,57	1,18	0,42	0,49	2,77	1,27	7,97
C-14:1	-	1,14	-	1,59	0,71	2,29	-	2,55	-	-
N.I.	0,35	0,48	0,30	0,60	0,44	0,60	0,72	0,29	0,33	0,64
C-16	14,52	16,89	9,04	12,02	8,75	9,86	5,50	16,03	13,50	9,36
C-16:1	11,53	3,31	10,15	11,26	8,57	10,71	3,03	6,50	6,63	5,20
C-17	tr	0,01	0,22	0,05	tr	0,04	0,01	0,34	0,20	0,20
N.I.	0,85	0,05	1,00	0,81	0,46	0,76	0,26	0,92	0,43	0,42
C-18	2,55	1,21	1,73	1,32	0,94	1,67	1,41	4,41	3,95	2,94
C-18:1	36,75	36,48	37,30	41,01	46,03	38,47	48,55	36,25	40,45	28,62
C-18:2	13,33	11,52	14,53	16,23	17,49	13,40	14,12	9,05	10,96	11,70
C-20	0,59	0,04	0,22	0,32	0,22	0,56	0,13	tr	0,37	0,51
C-18:3	1,96	5,37	3,06	3,07	4,56	3,46	3,97	2,77	3,80	2,82
C-20:1	0,85	1,27	1,13	1,22	1,04	1,29	0,84	1,74	0,46	0,86
C-20:2	0,59	3,83	0,91	1,22	1,81	0,90	1,20	2,32	1,51	1,08
C-20:3	0,59	0,56	0,45	0,95	1,13	0,90	0,84	0,22	0,69	1,20
C-22:1	1,53	1,52	1,63	1,49	3,43	1,74	2,53	0,92	2,09	2,60
N.I.	-	-	-	0,10	-	-	tr	-	-	-
C-22:2	tr	5,12	1,09	1,15	0,56	0,33	0,62	1,15	0,28	1,72
C-20:5	1,21	0,25	-	-	0,94	2,29	1,48	0,10	0,87	2,16
C-24:1	0,72	0,56	2,56	tr	1,65	0,18	1,12	1,73	0,69	2,38
N.I.	tr	-	-	tr	-	0,35	0,28	1,50	0,58	0,86
N.I.	tr	1,91	tr	0,21	-	0,42	0,41	4,64	0,58	1,08
C-22:5	tr	-	tr	0,16	-	0,47	0,34	-	0,63	0,42
N.I.	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr
C-22:6	4,77	4,02	12,80	4,58	tr	8,80	12,07	3,71	9,07	11,70
N.I.	-	0,31	tr	-	-	-	-	-	-	-
N.I.	-	1,02	tr	-	-	-	-	-	-	-

Indice

Iodo 105,96 110,54 145,8 117,68 109,95 140,4 154,8 92,8 128,3 136,34

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso

comercial adicionado de orujo de aceituna y grasa técnica

de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

N.I.: No Identificado ; tr: trazas

TABLA III.44

Composición en ácidos grasos de los monoglicéridos según el grado de insaturación (% en peso)

Ac. graso	L O T E									
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
Saturados	24,91	20,93	12,39	14,28	11,09	12,51	7,54	23,55	19,89	24,44
Monosaturados	51,38	44,28	52,77	56,57	61,43	54,68	56,07	49,69	50,32	39,66
Diinsaturados	13,92	20,47	16,53	18,60	19,86	14,63	15,94	12,52	12,75	14,50
Triinsaturados	2,55	5,93	3,51	4,02	5,69	4,36	4,81	2,99	4,49	4,02
Pentaisaturados	1,21	0,25	tr	0,16	1,10	2,76	1,82	0,10	1,50	2,58
Hexaisaturados	4,77	4,02	12,80	4,58	tr	8,80	12,07	3,71	9,07	11,70
No Identificados	1,20	3,77	1,30	1,72	0,90	2,13	1,67	7,35	1,92	3,00

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado

de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

En lo que se refiere al grado de insaturación (Tabla III.44) se observa, como en los diglicéridos, que los monoenoicos son los más abundantes seguidos de los saturados y dienoicos.

#### III.6.8.11 Ácidos grasos de la fosfatidilserina

Las Tablas III.45 y III.46 muestran la composición en ácidos grasos de la fosfatidilserina estudiando cada ácido graso por separado o agrupándolos según el grado de insaturación, respectivamente.

En la Tabla III.43 se observa que existen cinco ácidos grasos (C-16, C-18, C-18:1, C-18:2 y C-22:6) que son los más abundantes; dependiendo de las muestras el mayoritario será uno u otro. Todos ellos, en conjunto, representan más del 70% del total, excepto en la muestra Inicial debido al gran valor alcanzado por el C-20:5 (10,5%) y C-10 (7,8%).

Respecto del grado de insaturación de los ácidos grasos de la fosfatidilserina (Tabla III.46) debe señalarse que en términos generales, los saturados son los más abundantes, lo mismo que se ha observado en otros fosfolípidos. A continuación de los saturados se encuentran los dienoicos y hexaenoicos en proporciones próximas a 1:1. Los pentaenoicos de la muestra Inicial alcanzan un alto valor (12,34%) debido a la gran tasa existente de C-20:5.

TABLA III.45

Composición en ácidos grasos de la fosfatidilserina (% en peso)

L O T E										
Ac. graso	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-1
C-10	7,77	3,76	3,11	1,20	4,92	5,94	1,88	2,68	2,83	2,02
C-14	0,45	0,46	0,37	1,21	0,17	0,49	0,50	1,16	2,52	2,2
C-14:1	1,37	1,48	0,66	0,96	0,43	-	0,40	1,31	0,69	0,4
N.I.	1,52	-	0,50	0,54	0,52	0,59	0,27	0,31	0,32	0,3
N.I.	1,98	3,25	0,59	0,91	0,40	0,29	0,35	0,39	0,41	0,5
C-16	19,20	12,74	19,21	16,34	13,74	10,39	15,11	13,70	12,24	9,7
C-16:1	2,82	4,74	2,59	2,15	2,34	1,98	2,28	5,76	2,48	1,7
C-17	0,30	0,14	0,14	0,11	0,23	0,49	0,40	0,63	0,09	0,1
N.I.	0,45	0,14	0,18	0,14	0,29	0,59	0,44	0,39	0,13	0,2
C-18	9,37	10,32	17,13	20,98	15,20	10,49	17,08	20,61	19,74	19,7
C-18:1	12,80	20,68	20,17	17,37	17,19	15,74	23,45	18,47	17,39	18,
C-18:2	8,84	12,46	8,90	8,42	10,17	13,86	14,23	11,20	10,95	13,4
C-20	tr	0,46	tr	0,14	0,11	0,39	-	-	-	-
C-18:3	1,06	2,46	1,44	2,58	1,93	3,46	2,71	1,49	2,25	2,1
C-20:1	0,61	0,88	0,39	0,90	0,87	0,59	0,42	0,39	0,80	0,5
C-20:2	0,91	1,16	0,77	0,34	1,05	2,08	0,40	0,23	0,41	0,5
C-20:3	2,74	1,21	2,68	2,30	1,74	3,46	1,78	2,78	2,20	3,5
C-22	2,28	0,55	-	1,21	-	-	-	-	-	-
C-22:1	3,35	2,37	3,33	5,27	5,26	3,56	4,15	4,29	4,67	5,7
C-22:2	tr	tr	tr	-	0,11	tr	-	tr	tr	-
C-20:5	10,51	1,32	1,85	2,29	3,04	1,78	1,52	1,78	3,03	2,2
C-24	-	-	tr	0,57	0,20	tr	-	-	0,46	tr
C-24:1	-	0,69	0,55	1,11	0,61	tr	0,33	0,74	1,72	1,2
C-22:5	1,83	6,14	3,41	0,68	1,05	tr	tr	0,29	0,92	0,7
C-22:6	9,75	12,49	11,94	12,18	18,33	23,76	12,20	11,32	13,69	13,5

Indice

Iodo 142,37 149,13 128,8 121,52 154,98 183,43 128,64 120,53 136,02 139,

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso

comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica

de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.

tr: trazas

N.I.: no identificado.

TABLA III.46

Composición en ácidos grasos de la fosfatidilserina según el grado de insaturación (% en peso)

Ac. graso	L O T E									
	Inicial	C-45	OR-45	GT-45	C-70	OR-70	GT-70	C-100	OR-100	GT-100
Saturados	39,70	28,43	39,96	41,76	34,57	28,19	34,97	38,78	37,89	33,98
Monosacáridos	20,95	30,84	27,69	27,76	26,70	21,87	31,03	30,96	27,75	26,66
Dienoicos	9,75	13,62	9,67	8,76	11,33	15,94	14,63	11,43	11,36	13,95
Trienoicos	3,80	3,67	4,12	4,88	3,67	6,92	4,49	4,27	4,45	5,74
Pentacenoicos	12,34	7,46	5,26	2,97	4,09	1,78	1,52	2,07	3,95	3,02
Hexacenoicos	9,75	12,49	11,94	12,18	18,33	23,76	12,20	11,32	13,69	13,50
No Identificado	3,95	3,39	1,27	1,59	1,21	1,47	1,06	1,09	0,86	1,07

Inicial: lote de truchas común a los tres experimentales.

C, OR y GT: lote de truchas alimentadas con pienso comercial y pienso comercial adicionado

de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, respectivamente.

45, 70 y 100: días que las truchas recibieron su dieta correspondiente.



### III.6.9 Análisis sensorial

#### III.6.9.1 Prueba triangular

Procediendo según se describe en II.3.8.3.1 los miembros del jurado intentaron identificar la muestra diferente de las tres que se les presentaron.

A cada miembro del jurado se le presentaron dos grupos de tres muestras: el primero constituido por las procedentes del lote C-100 (truchas alimentadas con pienso comercial durante 100 días) y del lote OR-100 (truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna durante 100 días) en una de las seis combinaciones posibles (véase II.3.8.3.1), y el segundo compuesto por muestras del lote C-100 y del GT-100 (truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero durante 100 días) igualmente en una de las seis combinaciones posibles.

En relación con el lote OR, sobre un total de 16 miembros del jurado hubo 6 aciertos (37,5%) y la prueba triangular realizada en el lote GT deparó 7 aciertos (43,7%).

Llevados los datos a las tablas de la norma I.S.O./TC 34/SC 12 se comprobó que en ningún caso se llegó al número de aciertos mínimos requeridos (9) para poder establecer diferencias al nivel del 95%. Se concluyó, por lo tanto, que la suplementación de los piensos con orujo de aceituna o

grasa técnica de matadero no afecta organolépticamente al tejido muscular de la trucha.

#### III.6.9.2 Pruebas de preferencia

Cocinadas las truchas según se describe en II.3.8. 3.2 se les ofrecieron, sin identificar, a los distintos - miembros del jurado que puntuaron su opinión en la escala mostrada en la Figura II.11. Los resultados se expresan en la Tabla III.47 y Figura III.33. Aunque el lote Control al canzó en ambos ensayos una puntuación ligeramente superior, puede observarse que no es realmente significativa, dada la escasa diferencia entre los valores y las altas desvias ciones standard (Tabla III.47) halladas.

TABLA III.47

Valoración de las características organolépticas que se indican, en las pruebas de preferencia realizadas con los tres lotes de truchas estudiados

Lote	Sabor		Textura	
	$\bar{X}$	d.s.	$\bar{X}$	d.s.
C-100	5,8	1,9	6,0	1,8
OR-100	5,5	2,2	5,6	1,6
GT-100	4,7	2,0	5,3	1,7

$\bar{X}$ : media , d.s.: desviación standard.

C-100: lote de truchas alimentadas con pienso comercial durante 100 días.

OR-100: lote de truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna durante 100 días.

GT-100: lote de truchas alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero durante 100 días.

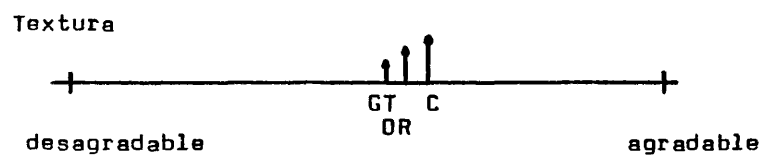
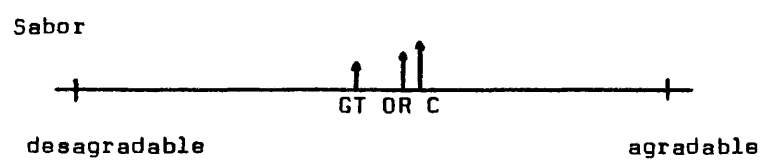


Figura III.33. Representación de los resultados  
medios de las pruebas de prefe-  
rencia efectuadas en los tres lo-  
tes de truchas.

#### IV. DISCUSION

##### IV.1 Composición química de los piensos

La Tabla III.1 recoge la composición del pienso Control y la de los Experimentales preparados mediante la adición de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero. De acuerdo con las opiniones más difundidas sobre el contenido en proteína de las dietas de los peces éste debe estar comprendido entre el 35-60% (NRC, 1977; Halver y Tiews, 1979) habiéndose establecido para la trucha un nivel nunca inferior al 40% (NRC, 1977). Se ha tenido en cuenta este criterio a la hora de preparar los piensos Experimentales. Dado que el pienso Control contenía un 43,6% de proteína bastó añadir solamente un 11% de cada uno de los subproductos alimentarios para rebajar el nivel proteico al tiempo que se incrementaba el contenido de grasa. Tal aumento evidentemente fué mucho mayor en el caso del pienso Experimental GT (adicionado de grasa técnica de matadero), mientras que en el pienso Experimental OR (adicionado de orujo de aceituna) el aumento más evidente fué el de la fibra bruta y el de los extractivos libres de nitrógeno.

En cualquier caso, los niveles de nutrientes, salvo el contenido en grasa del pienso Experimental GT que fué notablemente superior, se han mantenido entre las tasas aconsejadas para los piensos destinados a la alimentación de las truchas

(Meyer, 1969). Se podría haber aumentado aún más el porcentaje de grasa de ambos piensos experimentales, pero debido a la época del año en que se iban a realizar las experiencias (Marzo-Junio) no era aconsejable efectuar dicha modificación debido a que la temperatura del agua en este periodo es menor de 12°C (Fig.III.1). En estas condiciones, Atherton y Aitken (1970) han demostrado que no es aconsejable reducir drásticamente el nivel proteico. Es posible que en época estival se pueda rebajar aún más la tasa proteica del pienso y sustituirla por otro nutriente energético.

El nivel calórico final de las tres dietas refleja de una forma clara el mayor contenido en grasa del pienso Experimental GT.

#### IV.2 Temperatura del agua

El periodo de experimentación elegido fué de 100 días, comprendidos entre los meses de Marzo-Junio. La temperatura del agua en este periodo, como se observa en la Figura III.1 no sufrió amplias fluctuaciones sino que aumentó progresivamente a lo largo de la experiencia salvo en el primer tercio de este periodo, durante unos 8 días, en los que llegó a 10°C y cuando la experiencia prácticamente había finalizado se alcanzaron temperaturas superiores a los 10°C. Al ser este periodo sólo de tres días el aumento de temperatura no ha tenido in

fluencia posiblemente en los parámetros analizados en las muestras tomadas al final de la experiencia. La bibliografía describe investigaciones similares que se han realizado a temperaturas óptimas de desarrollo de las truchas. De aquí que los resultados obtenidos en tales condiciones no sean totalmente extrapolables a las que se dan en la práctica, debido a que el periodo de crecimiento de las truchas, desde la eclosión del huevo hasta alcanzar el tamaño comercial, es bastante mayor de un año. No cabe duda que las truchas en algún momento de su vida han de estar sometidas a estas temperaturas, mucho más si se tiene en cuenta que las piscifactorías están construidas para aprovechar el agua del curso alto de los ríos.

#### IV.3 Peso y talla de las truchas

Aunque al final de la experiencia las truchas del lote Control alcanzaron unos valores medios de talla y peso ligeramente mayores que los de los dos lotes experimentales no se puede afirmar que ello sea consecuencia de la dieta; si se observa la Tabla III.2 se puede comprobar que cada lote estaba constituido por una población muy heterogénea, incluido el inicial que respecto del peso presenta una desviación standard de  $\pm 12,27$  siendo el peso medio de 28,60 g. Similares consideraciones pueden hacerse en todos los lotes a lo largo de las experiencias. Esto induce a pensar que las diferencias antes descritas son más de carácter aleatorio que dependientes de la composición de la dieta.

En las Figuras III.2 y III.3 pueden observarse, en líneas generales, que tanto el peso como la talla aumentan de forma progresiva a lo largo de la experiencia. El peso parece sufrir una aceleración a partir de los 45 días.

En el lote OR (alimentado con pienso comercial adicionado de orujo de aceituna) se aprecia una deceleración o retraso del ritmo de incremento del peso en el último tercio de la experiencia. No se puede atribuir a un efecto perjudicial de alguna de las sustancias que componen el orujo de aceituna porque si fuera así se hubiera notado con anterioridad ya que previamente a esta deceleración los peces habían estado consumiendo dicho pienso durante 70 días sin haberse observado anomalía alguna. El índice de mortalidad fué, por tanto, prácticamente nulo en los tres lotes. Es posible que la deceleración observada sea fortuita y el efecto que se observa en la gráfica artificialmente al coincidir a los 70 días animales de peso medio superior al real y a los 100 días los de peso medio inferior.

La Figura III.3, relativa a la longitud de las truchas, muestra igualmente este efecto pero de una forma menos acusada.

#### IV.4 Composición química de las truchas

De la Tabla III.3 y las Figuras III.4, III.5 y III.6 se deduce que la humedad de la musculatura de las truchas del lote C (alimentadas con pienso Control) y OR (alimentadas con pienso



comercial adicionado de orujo de aceituna) disminuye un 2% en los 100 días que dura la experiencia, mientras que en el lote GT (alimentadas con pienso comercial adicionado con grasa técnica de matadero) esta disminución alcanza el 3%. Este descenso coincide con el incremento observado tanto en el contenido proteico (similar en los tres lotes) como en el contenido lipídico, algo superior (aproximadamente el 1%) en el lote alimentado con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero (lote GT). Como se observa en la Tabla III.3 la suma de humedad, grasa y proteínas dan cuenta de más del 99%. El resto, hasta alcanzar el 100%, hay que atribuirlo al contenido de cenizas ya que el de glucógeno en Salmo gairdnerii alcanza un valor de sólo el 0,12% cuando la trucha ha estado en reposo; tras 5 minutos de actividad muscular intensa el descenso del glucógeno hace que el porcentaje del mismo en el músculo se reduzca hasta el 0,02% (Black y col., 1962). Este último valor quizá sea el más indicado para las truchas utilizadas en esta experiencia dado que tras su captura en los estanques y hasta que se produce su muerte sufren convulsiones.

Los valores aquí obtenidos son muy semejantes a los encontrados por Kinsella y col. (1977a) para Salmo gairdnerii aunque difieren algo de los tabulados por Sidwell y col. (1974) en lo referente a la proteína para la que dan un valor del 22%, siendo mucho mayor en lo referente a la grasa que, para ellos, alcanza una tasa del 12%. Luquet (1971) obtiene valores infe-

riores de proteína (12,7-15,4%) y tasas de grasa más altas (12,6-15,6%), próximas a las de Sidwell y col. (1974). Estas diferencias pueden atribuirse a distintas variables que afectan a la composición química de la musculatura de los peces tales como edad, sexo, dieta, etc. que han sido estudiadas, entre otros, por Stansby (1969, 1973), Ackman (1967) y Exler y col. (1975).

Los valores obtenidos en este trabajo, al margen de ser muy similares a los descritos por Kinsella y col. (1977a) para Salmo gairdnerii, son también semejantes a los que estos mismos autores dan para otras especies de truchas (Salvelinus fontinalis y Salvelinus namaycush) y para otros peces de agua dulce.

#### IV.5 Composición en ácidos grasos de los piensos

En la Tabla III.5 se muestran los ácidos grasos que componen las fracciones apolares y polares de la grasa de los piensos. La finalidad de estas determinaciones era conocer los porcentajes de ácidos grasos esenciales (linoleico y linolénico) de los tres piensos, ya que se ha demostrado (Castell y col., 1972a; Yu y Sinnhuber, 1975) que es fundamental que estos ácidos grasos se encuentren en las dietas a una concentración determinada si se quiere obtener un buen crecimiento y si se pretende evitar enfermedades carenciales e incluso la muerte. Castell y col. (1972a) administrando diferentes dietas con distintos porcentajes de ácidos linoleico y linolénico demostraron

que ambos ácidos estimulan el crecimiento y mejoran el índice de conversión del pienso siendo el más eficaz el linolénico en la restauración de los efectos perjudiciales. Dichos autores establecieron las necesidades de linolénico de la dieta en un 1%. Posteriormente Yu y Sinnhuber (1975) confirmaron que el linolénico es un ácido graso esencial, aunque no siempre se necesite una concentración del 1% ya que cuando su tasa en la ración es inferior al 0,5% los efectos carenciales pueden ser paliados si el linoleico de la dieta se encuentra a concentraciones próximas al 1,5%. También demostraron que las concentraciones altas de linoleico (alrededor del 5%) ocasionan un retraso del crecimiento y una mortalidad próxima al 40%.

En resumen, toda dieta destinada a la alimentación de la trucha debe contener al menos un 1% de linolénico siempre y cuando no exista linoleico. La tasa de linolénico de la dieta puede reducirse a menos del 0,5% si se compensa con una tasa de linoleico comprendida, en términos generales, entre el 1 y el 4%.

Según se desprende de la Tabla III.7 el pienso comercial (Control) contiene 0,3% de linolénico y un 0,97% de linoleico, quizá un poco por debajo de los límites deducidos de los trabajos de Castell y col. (1972a) y Yu y Sinnhuber (1975). Con la adición de orujo de aceituna se logró aumentar ligeramente (hasta el 1,19%) la concentración de linoleico sin alterar la

de linolénico. El enriquecimiento del pienso comercial con grasa técnica de matadero permitió elevar la tasa de linoleico al 2,01% y la de linolénico al 0,5% lo cual se aproxima mucho más al equilibrio C-18:2/C-18:3 establecido por Yu y Sinnhuber (1975). Desde este punto de vista, las fórmulas de los piensos experimentales preparadas a partir del pienso comercial adicionado de orujo de aceituna o grasa técnica de matadero son totalmente adecuadas para la correcta alimentación de las truchas. Se ha logrado enriquecer los piensos en ácidos grasos esenciales con lo que se ha corregido la ligera deficiencia que presentaba el pienso comercial.

La composición de la dieta en los demás ácidos grasos no importa demasiado ya que la trucha, al igual que los mamíferos, sintetiza los ácidos grasos por las rutas metabólicas normales. Ya se ha mencionado (véase 1.4.1.3.3) que la grasa del pescado contiene un gran porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados de cadena mayor de 18 átomos de carbono. Se ha especulado con el carácter esencial del C-22:6w3 pero Castell y col. (1972) demostraron elegantemente que se puede sintetizar a partir del C-18:3w3 si existe una cantidad de éste, próxima al 1%, pasando previamente, por elongación de la cadena, por el C-20:3w3 y C-20:5w3 (Owen y col., 1975; Tinoco y col., 1979).

#### IV.6 Composición lipídica del músculo

#### IV.6.1 Tasa y evolución de los lípidos apolares y polares

La cuantificación independiente de los lípidos apolares y polares puede realizarse por dos métodos. El primero de ellos consiste en la separación mediante cromatografía en columna de ácido silícico de las fracciones apolares y polares y su cuantificación por pesada. La segunda, mediante la estimación del fósforo lipídico de una alícuota del extracto lipídico total, refiriendo los valores a una gráfica patrón constituida con un fosfolípido standard (Raheja y col., 1973), normalmente fosfatidilcolina. En el caso peculiar de los lípidos del pescado, el primer método lo ha usado Fernández y Burgos (1977) para cuantificar los componentes lipídicos de Salmo fario y el segundo Kinsella y col. (1977) para la determinación de los fosfolípidos de diversas especies de peces, entre ellas Salmo gairdnerii. El primer método, aunque sea más laborioso, presenta la ventaja de no ser destructivo y, por tanto, la muestra queda dispuesta para análisis adicionales. En éste trabajo se ha elegido el método de separación en columna de ácido silícico debido a que se pretendía también realizar un estudio de los componentes lipídicos de las fracciones apolar y polar.

Los resultados obtenidos en este estudio se recogen en las Tablas III.11, III.12, III.13 y la evolución de las fracciones lipídicas obtenidas pueden observarse en las Figuras III.10, III.11, III.13, III.14, III.15, III.16 y III.17. Todas estas

figuras muestran la evolución de las tres fracciones obtenidas (lípidos neutros, fracción eluida con acetona y fosfolípidos) de los tres lotes de truchas estudiados, respecto de grasa total (Fig. III.9, III.10 y III.11); la evolución de cada una de las fracciones en relación con la alimentación recibida (Fig. III.13, III.14 y III.15); la evolución de la totalidad de lípidos polares (fracción eluida con acetona más fracción eluida con metanol) respecto del extracto seco (Fig. III.16) y la relación lípidos apolares/polares respecto del tejido muscular (Fig. III.17).

Del análisis de los resultados puede concluirse en lo referente a las tasas de las fracciones lipídicas determinadas que:

- 1) la fracción lípidos neutros es la más abundante, alcanzando tasas superiores al 50% llegando incluso en alguna (GT-100) hasta el 73%.

- 2) la fracción eluida con metanol (fosfolípidos) es mucho menos variable; su tasa se aproxima a la tercera parte del material lipídico total.

- 3) la fracción acetona es muy variable alcanzando valores comprendidos entre el 0,88 y 9,14% de la grasa total. Es posible que estas variaciones sean un tanto artificiosas y dependan más del error del método empleado, por dos razones:

- a) con este sistema, se eluye con acetona alguna

pequeña porción de fosfolípidos como se puso de manifiesto en las cromatografías en capa fina realizadas con alícuotas de ésta fracción (véase III.6.5) y, a veces, también se pueden eluir los lípidos apolares no arrastrados por el cloroformo (Fernández, 1977).

b) se pueden cometer algunos errores al pesar pequeñas cantidades de lípidos eluidos de la columna que han arrastrado porciones del material utilizado como adsorbente (Koma-  
rek, 1964).

Las tasas de lípidos apolares y polares obtenidas son muy próximas a las descritas para Salmo gairdnerii por Kinsella y col. (1977a) que dan una cantidad de triglicéridos del 2,18% y de fosfolípidos del 0,87%. Naturalmente el valor hallado por Kinsella y col. (1977a) para los triglicéridos no corresponde en su totalidad a estas sustancias debido a que lo obtiene simplemente por diferencia entre la cantidad total de grasa y la suma de esteroides y fosfolípidos que él estima. El dato que Kinsella y col. (1977a) ofrecen como triglicéridos equivale exactamente a la fracción lípidos apolares exceptuando los esteroides y, por tanto, contiene también glicéridos parciales, ácidos grasos libres, tocoferol e hidrocarburos.

Puede decirse además que los valores obtenidos de las fracciones lípidos apolares y polares son similares a los encontrados en otros peces de agua dulce (Kinsella y col., 1977a)

tales como Salvelinus fontinalis, Ictalurus punctatatus, Aplo-  
dinotus grunniens y Morone americanus aunque en estas dos úl-  
timas especies las tasas de fosfolípidos son algo más bajas  
(0,26 y 0,30% respectivamente). Sin embargo, otros autores  
(Gray y MacFarlane, 1961) en truchas arco iris (Salmo iridis)  
han hallado valores mayores de lípidos apolares aunque el co-  
respondiente a fosfolípidos está próximo (0,63%) al obtenido  
en este trabajo. Estas discrepancias en los lípidos apolares  
se han de interpretar teniendo en cuenta que éstos son lípidos  
de depósito y están sometidos a influencias de diverso tipo:  
edad, sexo, dieta, etc. (Stansby, 1969, 1973; Ackman, 1967 y  
Exler y col., 1975).

Es interesante observar que la fracción lípidos polares  
no ofrece amplias variaciones en la musculatura procedente de  
diferentes peces ya sean de agua dulce o marina. Anteriormente  
se han ofrecido datos de algunas especies de agua dulce cuyos  
valores eran próximos a los obtenidos en este trabajo. Por lo  
que se refiere al músculo procedente de animales marinos se ha  
señalado que en el bacalao (Gadus morhua), los lípidos polares  
alcanzan un 0,52% (Addison y col., 1968), en la merluza (Merlu-  
cius capensis) 0,46% (Koning, 1966a), en la sardina "pilchard"  
(Sardina ocellata) 0,91% (Koning y McMullan, 1966) y en la ca-  
balla (Scomber scombrus) un 0,84% en el mes de Diciembre y un  
0,88% en Junio (Hardy y Keay, 1972). Quiere esto decir que la



fracción lípidos polares permanece relativamente constante en el pescado en general, siendo la fracción apolar la que varía ampliamente como se deduce de las tasas de la misma de los peces mencionados anteriormente que, en el orden citado, son de 0,07; 1; 3,9; 22,2 y 7,9%. Las cifras encontradas en el caso de la caballa (22,2% en Diciembre y 7,9% en Junio) reflejan la situación fisiológica del animal. En relación con esta observación, con nuestros resultados, se han obtenido las ecuaciones de regresión lineal del contenido en grasa respecto del contenido en lípidos apolares y polares (suma de la fracción eluida con acetona más fracción eluida con metanol).

En el primer caso se obtuvo la ecuación:

$$y = 0,9939 x - 0,8964 \text{ siendo}$$

y = porcentaje de lípidos apolares del tejido muscular

x = porcentaje de grasa total del tejido muscular

con un coeficiente de correlación del 0,923.

En el caso de la relación grasa total-lípidos polares la ecuación fué:  $y = 0,0047 x + 0,8837$  siendo

y = porcentaje de lípidos polares del tejido muscular

x = porcentaje de grasa total del tejido muscular

con un coeficiente de correlación de 0,011. Evidentemente los coeficientes de correlación nos muestran de una forma obvia

que la tasa de fosfolípidos es totalmente independiente de la cantidad total de grasa del músculo mientras que el contenido de lípidos neutros depende estrechamente de la tasa de grasa total.

En relación con las evoluciones de las fracciones lipídicas estudiadas en los tres lotes de truchas durante el periodo experimental se desprende:

1) la grasa total y los lípidos neutros evolucionan de una forma paralela, observándose un ligero descenso en los lotes C y OR (alimentados con pienso comercial y pienso comercial adicionado de orujo de aceituna) durante los primeros 45 días para aumentar ligeramente después. En el lote GT (alimentadas con pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero) se observa desde el principio un incremento progresivo (Fig. III.9, III.10 y III.11)

2) la fracción eluida con metanol (fosfolípidos) mantiene niveles similares a lo largo de toda la experiencia (Fig. III.9, III.10 y III.11).

3) se observan amplias fluctuaciones en la fracción eluida con acetona durante el periodo experimental y dado el bajo contenido de esta fracción, es probable que dependa mas de artificios metodológicos, que de cambios reales acaecidos durante el tiempo de la experiencia (Fig. III.15), como parece desprenderse de la Figura III.16 en la que se observa que

la evolución de la fracción polar en su conjunto (fracciones eluidas con acetona más metanol) muestra un comportamiento similar al señalado al estudiar la fracción metanólica. Evidentemente el descenso en los tres lotes desde el día 45 coincide con el aumento de los lípidos apolares a partir de ese día.

4) las Tablas III.14 y Figura III.17 permiten constatar de nuevo que al ser más abundantes los lípidos neutros disminuye la relación lípidos apolares/polares en los primeros 45 días, lo que se ha interpretado como una acomodación de los animales de los tres lotes al nuevo hábitat y alimentación, al pasar de los estanques de cría a los experimentales.

La relación lípidos apolares/polares obtenida por Fernández (1977) es también variable, con cocientes entre 0,4 y 3,3 que reflejan las variaciones acaecidas en ambas fracciones dependiendo de la época estudiada. En otros peces esta relación es también muy variable. En el bacalao (Gadus morhua) se aproxima a 1 (Addison y col., 1968) debido a su condición de pez magro. Sin embargo, en la caballa (Scomber scombrus) es de 28,6 en Diciembre (Hardy y Keay, 1972) dado el alto porcentaje de grasa que contiene en esta época del año, mientras que en Junio la relación desciende a 10,3.

#### IV.7 Lípidos apolares

En todos los extractos lipídicos, independientemente

del lote, se han identificado los siguientes componentes apolares: monoglicéridos, diglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, tocoferol, triglicéridos, hidrocarburos, ésteres del colesterol y tres sustancias de Rf 0,29, 0,37 y 0,75 que no se lograron identificar (véase III.6.3.2).

En conjunto se han identificado todas las sustancias descritas en otros trabajos de esta naturaleza, tanto en los peces de origen marino (Hardy y Mackie, 1969; Hardy y Keay, 1972) como en los de agua dulce (Fernández, 1977). No obstante hay que señalar que en Salmo fario (Fernández, 1977) no se detectan ésteres de los esteroides, aunque se admite generalmente (Lovern, 1962a) que aproximadamente 1/4 del colesterol del músculo del pescado se halla en forma de éster. No obstante, Hardy y Keay (1969) tampoco detectan ésteres de los esteroides en el músculo de la caballa (Scomber scombrus) aunque sí los encuentran en la grasa procedente del hígado y las gónadas de esta especie.

Es difícil saber qué tipo de sustancias son las manchas no identificadas. Es posible que alguna de ellas corresponda a las ubiquinonas, ya que algunos autores (Hardy y Mackie, 1969) las han detectado en el espadín (Sprattus sprattus). Sin embargo, por cromatografía en capa fina, Fernández (1977) aísla una mancha de Rf 0,45, comprendida entre el de los ácidos grasos libres y el de los triglicéridos, cuyo espectro y su máximo de

absorbancia a 275 nm le hacen pensar que pudiera tratarse de ubiquinonas. Para confirmar esta suposición somete la sustancia a la acción de borohidruro para comprobar si al reducirse aparece el desplazamiento clásico del máximo a 290 nm (Crane, 1959) cosa que no ocurre por lo que no pudo identificarla. Es posible que esta sustancia sea la misma que nosotros hemos encontrado entre el tocoferol y los ácidos grasos libres (véase Fig. III.18).

La mancha nº9 de Rf 0,75 observada encima y adyacente a los triglicéridos tampoco se logró identificar pero, como se ha descrito en III.6.3.2, bien pudiera tratarse de alguna fracción de triglicéridos cuyos ácidos grasos son más apolares debido a la mayor longitud de su cadena.

Los triglicéridos constituyen la fracción mayoritaria de los lípidos apolares; su tasa en todas las muestras variaba entre el 70 y el 84% del total de lípidos apolares (Tabla III. 17), tasas que son totalmente idénticas a las descritas por Gray y MacFarlane (1961) en esta misma especie. Estos resultados deben considerarse como normales ya que en los sistemas biológicos generalmente la mayoría de los lípidos apolares son triglicéridos. En el caso de la trucha resulta difícil comparar nuestros resultados con los de otros autores ya que no se han hecho estudios tan exhaustivos como los recogidos en este trabajo. Por ejemplo, Kinsella y col. (1977a) en un estudio

con 17 especies diferentes de peces de agua dulce describen la fracción triglicéridos como la total de lípidos apolares menos los esteroides. En este caso, al hablar de triglicéridos debe entenderse que también se incluyen otras fracciones minoritarias (diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres, etc.) Fernández (1977) sí analiza detalladamente en su estudio sobre Salmo fario la fracción apolar pero llega a unos resultados quizá demasiado llamativos ya que encuentra tasas muy elevadas de glicéridos parciales que sobrepasan, a veces, el 50% del total de los lípidos apolares, mientras que los triglicéridos en los casos mínimos sólo llegan al 15% y la tasa máxima que encuentra, sólo en una muestra, es del 66%, notablemente inferior a la mínima hallada en nuestro trabajo. Fernández (1977) justifica este hecho por tres posibles razones:

1.- que sea una situación real impuesta en determinado momento por exigencias metabólicas

2.- que se deba a determinaciones incorrectas debido a diferencias en el método utilizado

3.- que haya ocurrido una hidrólisis por lipasas en algún momento del estudio; no obstante, después de la discusión de sus resultados concluye que "por difícil que sea explicar el sentido de estas tasas tan elevadas, más difícil es admitir que estas no sean reflejo, más o menos fiel de la situación real". En cualquier caso, resultan muy raras tasas tan altas de glicéridos parciales (mono- y diglicéridos). No discrepa-

mos de las justificaciones que ofrece Fernández (1977) pero nos inclinamos a pensar que las del punto 2 sean las que participan con más peso basándonos en dos razones: a) las observaciones de Komarek (1964) quién afirma que se pueden cometer errores de pesada al arrastrarse parte del material utilizado como adsorbente; b) quizá ésta sea más poderosa, ya que en este trabajo (Tablas III.21 y III.22) se ha puesto de manifiesto la imposibilidad de cuantificar con precisión por pesada los glicéridos parciales pudiéndose cometer errores de incluso más del 100%. Por ello, se ha recurrido, en este trabajo, a la cuantificación por espectrofotometría infrarroja.

En otros peces como la caballa (Scomber scombrus) con alto contenido en grasa en su musculatura (24,1%) los triglicéridos alcanzan tasas situadas en torno al 90% de los lípidos apolares (Hardy y Keay, 1972; Ackman y Eaton, 1971), cantidades algo mayores a las encontradas en este trabajo, pero perfectamente justificables dado el alto contenido en grasa de este pez.

Los mono- y diglicéridos representan conjuntamente entre el 3 y 5% del total de lípidos apolares (Tabla III.17) lo que, en relación con la grasa total supone unos valores comprendidos entre el 2 y 4%, según se desprende de la Tabla III.18. Estos valores son similares a los descritos para la caballa (Scomber scombrus) por Hardy y Keay (1972). De nuevo hay que

insistir en las tasas tan elevadas encontradas para estos glicéridos parciales por Fernández (1977) que, en absoluto, son comparables con las aquí descritas.

La suma de esteroides libres y esterificados se sitúa en torno al 3% de los lípidos apolares (Tabla III.17) y al 0,2% del total de tejido muscular. Estos valores son similares a los hallados por Fernández (1977) en Salmo fario y superiores a los encontrados por Gray y MacFarlane (1961) en Salmo iridis. Este hecho es explicable si se tiene en cuenta que los lotes de truchas analizados por estos autores contienen un 6% de grasa total, mientras que las utilizadas en este trabajo se sitúan próximas a un 3% (Tabla III.3) y a que Gray y MacFarlane, (1961) en la fracción ésteres de los esteroides sólo detectan cantidades traza. Sin embargo, los valores de colesterol descritos para otros peces de agua dulce (Kinsella y col., 1977a) pueden considerarse similares a los de la trucha arco iris (Salmo gairdnerii) . El caso más discrepante quizá sea el de la perca (Perca flavescens) en la que la fracción esteroides alcanza el 0,09% del total del tejido muscular.

#### IV.8 Lípidos polares

Es habitual aislar los glicolípidos de un extracto lipídico arrastrándolos de la columna de ácido silícico/celita con acetona previa elución de los lípidos neutros con cloroformo



(Vorbeck y Marintti, 1965). No obstante, los resultados que se obtienen por este método no son homogéneos; así Fernández (1977) utilizando este método detecta lípidos neutros en la fracción eluida con acetona aunque también arrastra glicolípidos y nosotros en este trabajo, utilizando el método anterior, según se observa en la Figura III.24 además de los glicolípidos hemos detectado una serie de manchas positivas al reactivo de azul de molibdeno por lo que se identificaron como fosfolípidos. Dichos fosfolípidos se caracterizaron más tarde como fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina.

A la hora de cuantificar los distintos fosfolípidos fué necesario hacerlo conjuntamente con los eluidos con metanol.

Los fosfolípidos totales identificados fueron: lisofosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina.

En otros trabajos realizados con Salmo iridis (Gray y MacFarlane, 1961) se han caracterizado como fosfolípidos mayoritarios fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilserina. Sin embargo, en Salmo fario, Fernández (1977) no detecta fosfatidilserina que puede explicarse, en principio, por su elución con acetona ya que este autor utiliza las mismas condiciones cromatográficas que las empleadas en nuestro trabajo que han permitido eluir la fosfatidilserina

en su totalidad con la acetona; sin embargo Fernández (1977) tampoco detecta fosfatidilserina en esta fracción.

En los peces de origen marino en general, existen los mismos fosfolípidos que en Salmo gairdnerii. En los estudios que se han realizado al respecto en sardina "pilchard" (Sardina ocellata) (Koning y MacMullan, 1966) y en merluza del Cabo (Merlucius capensis) (Koning, 1966a), se han detectado además de los fosfolípidos encontrados en Salmo gairdnerii, liso - fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, aunque el primero de ellos sólo se encuentra en cantidades traza.

La fosfatidilcolina es siempre el fosfolípido mayoritario alcanzando tasas mayores del 50% (Tabla III.24) al igual que ocurre en las truchas Salmo iridis (Fernández, 1977) aunque si bien en esta última la fosfatidilcolina sigue siendo el fosfolípido mayoritario nunca llega al 50%. Estas consideraciones se hacen también extensibles a los peces de aguas marinas, cuya concentración de fosfatidilcolina es en todos los casos superior al 50% (Addison y col., 1968; Koning, 1966a; Koning y MacMullan, 1966).

Parece ser que la preponderancia de la fosfatidilcolina no es sólo específica de los peces, sino también de los crustáceos, tanto de origen marino (Addison y col., 1972) como de los de aguas continentales (Cossins, 1976) y de los moluscos, como la oreja marina (Haliotis midae) (Koning, 1966b), por lo

que puede afirmarse, de acuerdo con Christie (1973), que es el fosfolípido más abundante de los sistemas biológicos.

El segundo fosfolípido en abundancia en Salmo gairdnerii es la fosfatidiletanolamina; sus tasas están comprendidas entre el 20 y 30% (Tabla III.24) Gray y MacFarlane (1961) han encontrado en Salmo iridis un 21% de fosfatidiletanolamina y en Salmo fario Fernández (1977) detecta valores similares. Consideraciones idénticas a las efectuadas para la fosfatidilcolina pueden aplicarse a la fosfatidiletanolamina. Todos los autores antes citados en cada uno de los animales que estudian obtienen porcentajes próximos a los descritos anteriormente en Salmo gairdnerii. El único caso en el que la fosfatidiletanolamina sobrepasa el 30% es en la oreja marina (Haliotis midae) (Koning, 1966b).

La esfingomielina y cardiolipina alcanzan valores (Tablas III.24) similares comprendidos entre 4,5 y 8%. En Salmo iridis (Gray y MacFarlane, 1961) se encuentran valores de esfingomielina menores (2%). Sin embargo, hay que destacar en este caso que Fernández (1977) encuentra en Salmo fario valores de esfingomielina mucho mayores, entre el 10 y 24%, siendo todavía más variables en el caso de la cardiolipina (5-17%).

Los fosfolípidos minoritarios son la lisofosfatidilcolina y fosfatidilserina cuyos valores no llegan nunca al 5% salvo en la muestra OR-70. Estos valores pueden considerarse también como normales pues caen dentro de los señalados por

otros autores para diferentes tipos de peces.

Los datos recogidos en las Tablas III.24, III.25 y - III.26 indican que no existe diferencia alguna entre las tasas alcanzadas por los distintos fosfolípidos de los diferentes lotes, lo que permite deducir, teniendo en cuenta además las comparaciones realizadas anteriormente con los resultados de otros autores, que la dieta no influye en absoluto en las tasas de fosfolípidos presentes en la musculatura de la trucha.

#### IV.9 Composición en ácidos grasos

La práctica totalidad de los investigadores que han realizado estudios sobre la composición en ácidos grasos de los lípidos del pescado tanto de agua marina (Addison y col., 1968; Ackman y Eaton, 1966; Ackman y Eaton, 1971), como de aguas continentales (Kinsella y col., 1977; Gray y MacFarlane, 1961; Fernández, 1977), han demostrado que en la mayoría de los pecados los ácidos grasos saturados suelen tener de 12 a 24 átomos de carbono y los insaturados 14-22 átomos de carbono con 1-6 dobles enlaces.

Los ácidos grasos de número impar de átomos de carbono son muy poco abundantes y rara vez se detecta entre los insaturados, aunque en Coregonus albula se ha descrito la presencia de C-21:5w3 y de C-17:1 (Kaitaranta y Linko, 1979) y en Salmo

fario la de C-15:1 (Fernández, 1977). Estos ácidos grasos no cabe duda que proceden de fuentes dietéticas muy específicas tal como han demostrado Addison y col. (1973) en el eperlano (Osmerus mordax).

Las truchas analizadas en este trabajo no constituyen una excepción a la norma general, como puede observarse en las Tablas que se recogen en el apartado III.6.8; tanto en los lípidos apolares como polares sólo se detectan, entre los ácidos grasos saturados de cadena par, el C-14, C-16, C-18, C-20, C-22 y C-24. Este último muchas veces en cantidades traza, sobre todo en los lípidos neutros. Igualmente de los insaturados se detectan los descritos como normales en los trabajos citados anteriormente.

De los impares sólo se detecta el C-17 aunque alguno de los que se recogen en las tablas inmediatamente antes del C-16 como no identificados no cabe duda que se trata del C-15, pero no se ha podido determinar cuál de ellos es exactamente ya que, como han demostrado Kaitaranta y Linko (1979), antes del C-16 y con pocas diferencias en su tiempo de retención aparecen el anteiso C-15; el C-15 y el iso C-16.

Otra observación de carácter general digna de destacar se es el hecho de que los lípidos polares del pescado contienen casi siempre un mayor porcentaje de ácidos grasos polienoicos, en particular C-22:6w3 (Hardy y Mackie, 1969; Ackman

y col. 1976). En la trucha arco iris (Salmo gairdnerii) analizada en este trabajo se observa un fenómeno similar. Compárese, por ejemplo, la Tabla III.27, que muestra la composición en ácidos grasos de los triglicéridos, con las Tablas III.29 y III.31 que representan a los dos fosfolípidos mayoritarios (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina). Puede observarse que en el caso de los triglicéridos nunca se alcanza un porcentaje de C-22:2 del 4%, mientras que en los fosfolípidos mencionados la tasa mínima de este ácido graso es el 14% y la mayor sobrepasa el 30%. Similares consideraciones se podrían hacer acerca del C-20:5 que no llega, en los triglicéridos, al 1% y en los fosfolípidos antes citados puede ser incluso superior al 4%. No puede decirse lo mismo de los ácidos grasos de los peces marinos cuyos valores de C-20:5 son relativamente elevados en ambas fracciones (Ackman y col., 1976; Masson y Burgos, 1973; Braddock y Dugan, 1972). Es posible que la presencia de C-20:5 en los triglicéridos y fosfolípidos del pescado dependa de la cantidad que hay en la dieta (Yu y col, 1977). Aunque también es posible su síntesis a partir de C-18:2 y C-18:3, ya que así puede deducirse de otro trabajo de Yu y Sinnhuber (1975) y el C-20:5 se destina probablemente primero a formar parte de los fosfolípidos y después el sobrante, o bien se metaboliza, o bien pasa a formar parte de la grasa de depósito. En nuestras experiencias resaltan las consideraciones anteriores ya que los piensos contenían en torno al 3% de C-20:5 y en los triglicéridos se observan concentraciones menores del 0,9% mientras

que las tasas de C-20:5 en los fosfolípidos fueron alrededor del 4%.

Resulta difícil comparar la composición en ácidos grasos de los triglicéridos del músculo de la trucha que hemos encontrado con los resultados dados por otros autores ya que lo habitual es determinar los ácidos grasos de la totalidad de la grasa o bien estimarlos por separado en los lípidos apolares y fosfolípidos. Muy pocas veces se han analizado, por separado, los ácidos grasos que componen las distintas fracciones tanto de los lípidos apolares como la de los fosfolípidos. La composición en ácidos grasos de las distintas fracciones lipídicas sólo se detalla en los trabajos de Gray y MacFarlane (1961) y de Fernández (1977). En términos generales puede decirse que las tasas de ácidos saturados C-14, C-16 y C-18 que hemos hallado son muy similares a las encontradas por Gray y MacFarlane (1961) en Salmo iridis. La suma de los monoenoicos se sitúa en torno al 50%, tanto en nuestro trabajo como en el de Gray y MacFarlane (1961), debido principalmente al C-16:1 y al C-18:1. Sin embargo, existen amplias diferencias entre los insaturados no monoenoicos y Gray y MacFarlane (1961) - hasta detectan la existencia de C-20:4 a una concentración del 1,3% lo que no ocurrió en las muestras analizadas por nosotros en este trabajo.

Los resultados que obtiene Fernández (1977) con Salmo fario son mucho más difíciles de analizar, dado que su estudio

está realizado con la intención de conocer las variaciones estacionales sufridas por la grasa y sus ácidos grasos, hallando diferencias muy acusadas dependiendo de la época de captura con tendencia a aumentar el grado de insaturación en los meses de verano a expensas de los ácidos grasos poliénoicos.

Los fosfolípidos mayoritarios son fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina que en su conjunto dan cuenta del 80% del total de fosfolípidos. Por ello se ha creído conveniente estudiar más exhaustivamente la composición en ácidos grasos de estos fosfolípidos que van a ser los que contribuyan de una forma decisiva a la composición global de ácidos grasos de los fosfolípidos. Comparando las tasas de ácidos grasos de la fosfatidilcolina (Tablas III.29 y III.30) con los valores dados por Gray y MacFarlane (1961) se observa que salvo el C-18, que en ambos casos se encuentra en concentraciones próximas al 2%, en todos los ácidos grasos restantes existen diferencias significativas. No es posible encontrar una explicación razonada a divergencias tan acusadas, salvo las influencias de la dieta. Sin embargo, nuestros valores están muy próximos a los descritos por Fernández (1977) para la fosfatidilcolina a pesar de que la alimentación de los peces que él utilizó sea la natural.

Los ácidos grasos de la fosfatidilcolina presentan una tasa de saturados más alta que la de la fosfatidiletanolamina debido principalmente a la mayor abundancia en C-16 y a la me



nor tasa de C-22:6 ya que las tasas de mono-, di-, tri-, y pentanoicos pueden considerarse semejantes. Estas diferencias - quedan reflejadas en las Figuras III.30, III.31 y III.32 en las que siempre se observa un mayor índice de iodo en la fosfatidiletanolamina, debido sin duda a su mayor riqueza en C-22:6. Este hecho no sólo ocurre en la trucha, sino también en peces de vida marina como bacalao (Gadus morhua) en el que se ha observado (Addison y col., 1968) que mientras la fosfatidilcolina contiene un 23,9% de C-16, la fosfatidiletanolamina sólo alcanza un 8,8% e igualmente el C-22:6 de la primera representa un 27,3%, mientras que en la fosfatidiletanolamina llega hasta el 40,5%. Las concentraciones del resto de los ácidos grasos pueden considerarse, en cierto modo, similares.

En la bibliografía se compara frecuentemente la composición de los ácidos grasos de los lípidos neutros y de los fosfolípidos del pescado pero siempre analizando ambas fracciones en su totalidad. En el trabajo realizado por Kinsella y col. (1977) con diversas especies de peces de agua dulce se llega a la conclusión de que los ácidos grasos predominantes en los peces de agua dulce son: C-16, C-16:1, C-18:1, C-20:5, C-22:5 y C-22:6 aunque hay amplias variaciones entre las distintas especies. Las variaciones más destacables son una tasa mayor de C-16 y C-18:1 en los peces más grandes mientras que C-20:5 y C-22:6 se presentan en mayor concentración en las especies más pequeñas y dentro de la misma especie, cuanto mayor es el

ejemplar más alta es la concentración de C-16, C-16:1 y C-18:1 siendo inversamente proporcional al tamaño la concentración de C-20:5 y C-22:6.

Frente a las especies de origen marino (Ackman, 1979) las de agua dulce contienen habitualmente mayores niveles de la serie w6, particularmente de C-18:2w6.

Por lo que se refiere a la composición en ácidos grasos de las truchas arco iris (Salmo gairdnerii), las que hemos analizado presentan en sus triglicéridos unos niveles de C-16 y C-16:1 similares a los descritos por Kinsella y col. (1977). Sin embargo la tasa de C-18:1 es mucho mayor, siendo menores las de C-20:5, C-22:5 y C-22:6. Igualmente el valor alcanzado por el C-18:2 es mucho mayor en nuestras experiencias. Por otra parte en la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina se observa que los ácidos grasos C-16, C-18:1, C-18:2, C-20:5 y C-22:5 se mantienen en los niveles descritos por Kinsella y col. (1977). Sin embargo, hay una menor cantidad de C-16:1 y C-22:6. Estas diferencias hay que atribuir las a los diversos factores que influyen en la composición en ácidos grasos de los lípidos musculares. También es posible que no existan tales diferencias ya que Kinsella y col. (1977) analizan los ácidos grasos que componen la grasa total, mientras que en nuestro estudio se han analizado los ácidos grasos de cada una de las fracciones lipídicas que forman parte de la grasa. Las tasas de C-22:6 encontradas cuando hemos estudiado los triglicéridos, no so-

brepasan el 5%, mientras que Kinsella y col. (1977) también en Salmo gairdnerii encontraron valores de hasta el 21%. No obstante, en la fosfatidilcolina y en la fosfatidiletanolamina hemos encontrado valores próximos y superiores al 20% respectivamente. Kinsella y col. (1977) al analizar los ácidos grasos de una forma global también obtienen valores relativamente altos de éste ácido graso, lo que contrasta con los resultados de otras publicaciones anteriores (Stansby, 1973; Stansby, 1969) y que lo atribuyen a la pequeña proporción de lípidos neutros que encuentran en el músculo de las truchas; por tanto hay que concluir que el C-22:6 deriva de los fosfolípidos.

#### IV.9.1 Influencia de la dieta en la composición en ácidos grasos de los lípidos del músculo

En el apartado III.6.8 quedó demostrado que la suma de triglicéridos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina representa alrededor del 75% del total de la grasa muscular. Si la composición en ácidos grasos de la dieta influyera de alguna forma en la de las diferentes fracciones lipídicas ello se reflejaría principalmente en las tres o en alguna de ellas. De ahí que hallamos preferido analizar con más profundidad la composición en ácidos grasos de estos componentes mayoritarios, prestando menor atención a otras fracciones minoritarias (fosfatidilserina, cardiolipina, diglicéridos, etc.).

Son muchos los estudios realizados sobre la influencia de la dieta en la composición en ácidos grasos de la grasa muscular y de otros órganos de la trucha arco iris (Salmo gairdnerii). Sin embargo, en nuestra opinión los resultados que se obtienen no reflejan en realidad el efecto que la dieta ejerce en los ácidos grasos acumulados, debido a que la gran mayoría de los autores estudian la composición global en ácidos grasos, es decir, analizan los ácidos grasos del total de la grasa sin tener en cuenta que la fracción lípidos neutros, representada principalmente por triglicéridos, constituye una grasa de depósito y es acumulada por el pez como tal, mientras que los fosfolípidos cumplen funciones estructurales y por tanto han de tener una composición en ácidos grasos específica para realizar sus funciones. En nuestra opinión habría que realizar estudios de esta naturaleza analizando independientemente, al menos, las fracciones lípidos apolares y polares. Esta opinión está apoyada por los resultados de Yu y Sinnhuber (1975) y - Castell y col. (1972). Estos autores preparan dietas en las que la composición en ácidos grasos se restringe a una serie limitada de ácidos grasos incluidos los esenciales. Observan que en los lípidos neutros de la trucha los ácidos grasos mayores de 18 átomos de carbono, salvo en el caso de C-18:3 y C-20:1, ninguna llega al 0,7%, mientras que los fosfolípidos contienen tasas superiores de estos ácidos grasos, en especial del C-22:6 que en ocasiones supera el 5% (Castell y col. 1972). Yu y Sinnhuber (1975) utilizando dietas que sólo contienen

concentraciones diferentes de C-12, C-18:3w3 y C-18:2w6 y al margen de las eficiencias nutritivas del pienso y de la mortalidad, observaron hechos similares, aunque las concentraciones de los ácidos grasos de cadena muy larga (más de 20 átomos de carbono) fueran algo mayores que las descritas por Castell y col. (1972), siendo la de los fosfolípidos en cierto modo semejantes a las reales cuando el equilibrio C-18:2/C-18:3 es correcto en la dieta. Demuestran así la esencialidad del linoleico y linolénico e indican las concentraciones mínimas necesarias de los mismos, pero también se puede sacar como conclusión que en los fosfolípidos se acumulan los ácidos grasos C-22:1, C-20:5, C-22:5 y C-22:6 que requieren las truchas para que su fisiologismo sea el correcto.

En resumen, parece lógico concluir que si se pretende conocer la influencia de los ácidos grasos de la dieta en la composición en ácidos grasos de la grasa de la trucha, es preciso separar la fracción apolar y polar aunque desde otro punto de vista, el organoléptico, sea más eficaz estudiar la grasa en su totalidad. Siguiendo este criterio Yu y col. (1977) realizan un trabajo con diferentes dietas cuya composición en ácidos grasos es muy compleja y concluyen que la influencia de la composición en ácidos grasos de la dieta en la de la grasa corporal sólo se refleja en los siguientes ácidos grasos: C-14, C-16:1, <sup>C-18:2, C-20:1</sup> C-18:4, C-22:1, C-20:4, C-20:5 y C-22:6. Parte de estas observaciones ya se habían hecho, en realidad, anteriormente en algunos peces marinos; así la grasa del arenque del Atlántico

(*Clupea harengus*) contiene una gran proporción de C-22:1w11, - incluso hasta un 21%, debido a que consumen copépodos que contienen ácidos alcoholes con un alto contenido de este ácido (Ackman y col., 1974; Pascal y Ackman, 1976). La influencia de la dieta en lo relativo a los ácidos grasos no sólo se ha observado en peces, sino también en mamíferos marinos. Por ejemplo, la ballena del Atlántico Norte tiene un alto contenido de C-22:1 debido a su alimentación, compuesta principalmente por crustáceos del zooplacton con una gran proporción en este ácido graso (Ackman y col., 1970). Como contraste, la ballena del Atlántico Sur posee en sus lípidos una menor riqueza debido a que su alimento principal es el krill cuya - tasa de C-22:1 no supera el 0,4% (Mori y Hikichi, 1976).

Tras estas consideraciones parece lógico centrarse en la influencia de la dieta en los ácidos grasos C-14, C-16:1, C-18:2, C-20:1, C-18:4, C-22:1, C-20:4, C-20:5 y C-22:6 de las fracciones lipídicas mayoritarias: triglicéridos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

#### IV.9.1.1 Acido mirístico (C-14)

La mayor concentración de C-14 siempre se presenta en los triglicéridos (Tabla III.27) de las truchas alimentadas con pienso Control. Ello no se debe a la influencia de la dieta ya que de una parte el pienso del lote Control es el más -

pobre en dicho ácido graso (Tabla III.7) y de otra, las concentraciones alcanzadas pueden considerarse como normales tanto en la trucha (Salmo gairdnerii) como en otras especies de peces de agua dulce (Kinsella y col, 1977), e incluso en los triglicéridos musculares de truchas arco iris alimentadas con dietas carentes de este ácido graso (Castell y col., 1972); ello indica que sin lugar a dudas la trucha puede sintetizarlo. Tampoco se aprecian diferencias destacables en el contenido de C-14 de la fosfatidilcolina y de la fosfatidiletanolamina (Tablas III.29 y III.31), en las que se han detectado concentraciones similares a las señaladas por otros autores, tanto en peces de agua dulce, por ejemplo Salmo fario (Fernández y Burgos, 1977) como en los de origen marino (Addison y col., 1968).

#### IV.9.1.2 Acido palmitoleico (C-16:1)

En los triglicéridos (Tabla III.27) se observa que en el lote GT (lote de truchas alimentadas con pienso comercial de grasa técnica de matadero) existe siempre un porcentaje más bajo de C-16:1. Si se observa la Tabla III.7 puede comprobarse que es precisamente el pienso GT el más rico en C-16:1 por lo que no puede atribuirse este efecto a una influencia de la dieta. Por otra parte, el contenido en este ácido graso de los triglicéridos de este lote es mayor que el encontrado por Castell y col. (1972), pero hay que tener en cuenta que las dietas que utilizan dichos autores no poseen más ácidos grasos

que los C-12, C-18:2 y C-18:3; Yu y col. (1977) encontraron concentraciones mayores que las nuestras.

La concentración de C-16:1 en los fosfolípidos (Tablas III.29 y III.31) es muy parecida en todos los lotes y concuerda con los resultados obtenidos por otros autores en Salmo fario (Fernández y Burgos, 1977) y Salmo gairdnerii (Castell y col., 1972; Yu y col., 1977).

#### IV.9.1.3 Acido linoleico (C-18:2)

Este es uno de los ácidos grasos esenciales y por lo tanto debe estar presente siempre en la dieta junto con C-18:3 $\omega$ 3 con el colabora previniendo los problemas carenciales (véase 1.2.1.2.3). A pesar de que los piensos experimentales OR y GT contienen una mayor tasas de este ácido graso, ello no se re-fleja en absoluto en los ácidos grasos que componen los tri-glicéridos (Tabla III.27), a los fosfolípidos mayoritarios (Ta-bla III.29 y III.31). Cuando se enriquecen las dietas en este ácido graso se mejora la proporción linoleico/linolénico, aproximándose más a las recomendaciones de Yu y Sinnhuber (1975) y es posible que se incremente la eficacia de la dieta, pero en las tasas aquí utilizadas no parece influir en la composi-ción en ácidos grasos de los triglicéridos. Los valores halla-dos en la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina son mayores que los dados por Fernández y Burgos (1977). Sin embargo, son menores que los encontrados por Yu y Sinnhuber (1975) cuando



se suministran a los peces dietas ricas (más del 1,5%) en este ácido graso.

#### IV.9.1.4 Acido eicosenoico (C-20:1)

La concentración de este ácido graso de la dieta fué exactamente la misma en los tres piensos utilizados (Tabla - III.7). En los lípidos del pescado no se observó ninguna variación y de hecho tanto en los triglicéridos (Tabla III.27) como en la fosfatidilcolina (Tabla III.29) su concentración varía, en términos generales, entre 0,5 y 1,5%. En los triglicéridos del lote Inicial se observa una concentración ligeramente mayor que puede ser reflejo del contenido de la dieta que consumieron las truchas antes de iniciarse las experiencias.

Sin embargo, en la fosfatidiletanolamina (Tabla III.31) se observan a veces (lotes C-70 y C-100) concentraciones superiores al 3% lo que no se debe a la influencia de la dieta.

#### IV.9.1.5 Acidos octodecatetraenoico y araquidónico (C-18:4 y C-20:4)

Son ácidos grasos poco frecuentes. En nuestro trabajo no hemos logrado detectarlos aunque es posible que el ácido graso no identificado que figura en la Tabla III.31, después del C-20:3, como componente de la fosfatidiletanolamina sea

el C-20:4. En cualquier caso sólo se detectó en este lípido polar, en cantidades traza y no en todas las muestras.

Tampoco pudo detectarse en las grasas de los piensos analizados.

#### IV.9.1.6 Acido erúcico (C-22:1)

Se ha demostrado repetidas veces que la riqueza de este ácido graso de la dieta se refleja en la composición de los ácidos grasos de los lípidos del músculo (véase 1.4.1.3.2 y Yu y col., 1977).

Dado que los tres piensos utilizados contienen idénticas tasas en este ácido graso es evidente que no puede pretenderse observar diferencias en los ácidos grasos de las tres fracciones lipídicas estudiadas.

Los porcentajes mayores observados en la fosfatidiletanolamina (Tabla III.31) de algunos lotes son independientes del contenido de la dieta.

#### IV.9.1.7 Acido docosahexaenoico (C-22:6)

Es quizá el único que puede reflejar una cierta influencia, ya que es el pienso Control el que contiene una mayor cantidad del mismo y en el caso de la fosfatidiletanolamina (Tabla III.31) se observa que el lote alimentado con este pienso

es el que mayores porcentajes de C-22:6 ofrece, aunque no puede decirse lo mismo en la fosfatidilcolina (Tabla III.29).

Como conclusión puede afirmarse que respecto del pienso Control los experimentales empleados en este trabajo determinan un mejor equilibrio de las proporciones de los ácidos grasos esenciales, que caen dentro de los límites descritos por Yu y Sinnhuber (1975). No obstante, como se ha visto anteriormente, la composición en ácidos grasos de la dieta no influye, al menos de una forma detectable en la composición de los ácidos grasos de las distintas fracciones lipídicas estudiadas, a pesar de que se pueden observar amplias diferencias en los piensos, al menos en el Experimental GT (pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero) en la riqueza de algunos ácidos grasos (Tabla III.7), tales como C-16, C-18, C-18:1 lo que permite deducir que el exceso de estos ácidos grasos en el pienso se utiliza como fuente energética.

Estos resultados globales no concuerdan con los obtenidos por Higuera y col. (1977) en un estudio similar en el que a un pienso comercial le adicionan para preparar la dieta experimental un 10% de "tocino tratado" (sic.). Dichos autores afirman que la grasa que se acumula en el músculo depende de la dieta. Sin embargo hay que decir que sólo analizan los 6 ácidos grasos mayoritarios (C-14, C-16, C-16:1, C-18, C-18:1 y C-18:2) y observan, en el músculo, que no hay diferencias en los ácidos C-14 y C-16:1 de la grasa del músculo de las truchas

alimentadas con ambas dietas probablemente debido a que tampoco había diferencias notables en las tasas de estos ácidos grasos del pienso. Sin embargo, observan diferencias claras en C-16, C-18 y C-18:1, justamente en los ácidos grasos que Yu y col. (1977) opinan que no se ven influenciados por la dieta. En este sentido Castell y col. (1972) y Yu y Sinnhuber (1975) con dietas carentes de estos ácidos grasos observan que las tasas de estos ácidos grasos en el músculo de los peces alcanzan valores normales, lo que indica que el animal los puede sintetizar. Nuestros resultados, aunque en contraposición con los de Higuera y col. (1977), se ven apoyados por las observaciones de Yu y col. (1977) dada la escasa diferencia en las tasas de los ácidos grasos estudiados en este apartado en los tres piensos utilizados.

#### IV.10 Análisis sensorial

Los resultados de las pruebas organolépticas realizadas para conocer las posibles diferencias existentes en las truchas alimentadas con los tres lotes de pienso se recogen en III.6.9.

En la prueba triangular no se llegó al número de aciertos mínimos necesario para establecer diferencias al nivel del 95% y en las pruebas de preferencia la puntuación de los distintos lotes se consideró que era similar. Estos resultados ratifican, en cierto modo, los análisis del material lipídico.

En un estudio de la misma naturaleza realizado por Higuera y col. (1977) a pesar de que encuentran influencias de la dieta en la composición de ácidos grasos del músculo, no detectaron diferencias entre las dos muestras estudiadas mediante la prueba triangular que realizan para establecer diferencias sensoriales.

Ni por el método analítico ni por el sensorial se pudo encontrar diferencia alguna entre las truchas alimentadas con las distintas dietas. Por lo tanto, ha de concluirse que se puede disminuir el contenido proteico de un pienso comercial mediante la adición de grasa procedente de los subproductos de la industria alimentaria aquí utilizados. Con ello se consigue un descenso del nivel proteico en un 4% para el pienso Experimental OR (pienso comercial adicionado de orujo de aceituna) y del 6% para el Experimental GT (pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero), lo que implica evidentemente un abaratamiento del pienso.

### CONCLUSIONES

1.- Los dos piensos experimentales utilizados, uno formado por pienso comercial adicionado de orujo de aceituna y otro por el mismo pienso comercial al que se añadió grasa técnica de matadero, no influyeron ni en el peso ni en la talla de las truchas, siendo estos parámetros similares a los de los animales alimentados con el pienso control (pienso comercial).

2.- A pesar de que al final de la experiencia en las truchas alimentadas con el pienso comercial adicionado de grasa técnica de matadero se observó un porcentaje de grasa ligeramente mayor que en las demás, ello no se atribuyó a la riqueza en grasa de este pienso, puesto que en todos los casos, el contenido graso de las truchas estudiadas cae dentro de los límites señalados en la bibliografía para esta especie independientemente de su alimentación.

3.- Las tasas del resto de componentes son similares en las truchas alimentadas con los tres tipos de pienso.

4.- Al adicionar al pienso comercial orujo de aceituna o grasa técnica de matadero, se consiguió una relación más equilibrada de los ácidos grasos esenciales, linoleico - linolénico.

5.- Independientemente del pienso recibido, la fracción lipídica apolar de la musculatura de la trucha, en términos generales, es siempre más abundante que la polar, siendo su relación media de 1,9. Las variaciones que se observan en las distintas muestras reflejan siempre las diferencias existentes en la fracción apolar, ya que el contenido de lípidos polares permanece relativamente constante.

6.- En la fracción apolar se han detectado 11 componentes de los que no se han podido identificar 3; los 8 restantes se caracterizaron como monoglicéridos, diglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, tocoferol, triglicéridos, hidrocarburos y ésteres del colesterol. El mayoritario fué siempre la fracción triglicéridos que representa aproximadamente el 75% del total de los lípidos apolares.

7.- En este trabajo se ha demostrado que las fracciones lipídicas minoritarias no se pueden cuantificar con exactitud por gravimetría. En el caso de los mono- y diglicéridos un método de cuantificación muy eficaz es la espectrofotometría infrarroja. Cuando el glicérido estudiado constituye una gran parte de la fracción lipídica total, como en el caso de los triglicéridos, también es útil el método gravimétrico.

8.- Una vez eluidos con cloroformo los lípidos apolares, la elución de la columna cromatográfica con acetona no aisla específicamente a los glicolípidos arrastrándose también parte de los fosfolípidos y en particular la fosfatidilserina.

9.- En la fracción polar se detectaron 6 fosfolípidos que se identificaron como: lisofosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina. Los más abundantes fueron fosfatidilcolina (en torno al 55%) y fosfatidiletanolamina (alrededor del 25%).

10.- El ácido graso mayoritario (34-44%) de los triglicéridos es siempre el C-18:1 seguido del C-16 (17-22%) y del C-18:2 (10-12%). El C-22:6 que es muy abundante en los fosfolípidos, sólo alcanza pequeños valores en los triglicéridos, como máximo un 3,84%.

11.- El ácido graso más abundante de la fosfatidilcolina es el C-16 (25-37%) seguido de los C-18:1 (15-19%) y C-22:6 (14-32%) y lo mismo acaece con la fosfatidiletanolamina aunque existen grandes fluctuaciones entre los diferentes lotes.



12.- En el resto de las fracciones estudiadas los ácidos grasos más abundantes son los C-16, C-18:1, C-18:2 y C-22:6 si bien en los monoglicéridos el C-16:1 alcanza una gran proporción (3-11%) y lo mismo sucede en la fosfatidilserina con el C-18 (9-20%).

13.- Las pruebas sensoriales realizadas no pusieron de manifiesto diferencia alguna en las características organolépticas de las truchas de los tres lotes.

14.- Como conclusión global puede afirmarse que se puede rebajar la tasa proteica de los piensos comerciales mediante la adición de subproductos de la industria alimentaria sin que se vean afectados, ni los parámetros químicos, ni las características organolépticas de las truchas.

BIBLIOGRAFIA

- ACKMAN, R.G. (1964). J. Fish. Res. Bd. Can. 21, 247 .
- ACKMAN, R.G. (1967). Comp. Biochem. Physiol. 22, 907.
- ACKMAN, R.G. (1979). Advances in Fish Science and Technology.  
Ed. J.J. Connell. Publicado por Fishing News Books Ltd.,  
Farnham, Surrey, England, pag. 86-98.
- ACKMAN, R.G. y BURGHER, R.D. (1964). J. Fish. Res. Bd. Can.  
21, 367.
- ACKMAN, R.G. y EATON, C.A. (1966). J. Fish. Res. Bd. Can.  
23, 991.
- ACKMAN, R.G. y EATON, C.A. (1971). Can. Inst. Food Sci. Technol.  
1, 4, 169.
- ACKMAN, R.G., EATON, C.A. y HINGLEY, J.H. (1976). J. Sci.  
Food Agric. 27, 1627.
- ACKMAN, R.G., EATON, E.A. y LINKE, B.A. (1975). Fish. Bull.  
73, 838.
- ACKMAN, R.G., EATON, C.A., SIPOS, J.C., HOOPER, J.N., CASTELL,  
J.D. (1970). J. Fish. Res. Bd. Can. 27, 513.
- ACKMAN, R.G., EPSTEIN, S. y KELLEHER, M.A. (1974). J. Fish.  
Res. Bd. Can. 31, 1803.
- ACKMAN, R.G., KE, P.J., MacCALLUM, W.A. y ADAMS, D.R. (1969).  
J. Fish. Res. Bd. Can. 26, 2037.
- ACKMAN, R.G., LINKE, B.A. y HINGLEY, J. (1974). J. Fish. Res.  
Bd. Can. 31, 1812.

- ACKMAN, R.G. y McLACHLAN, J. (1977). Proc. N S Inst. Sci.  
28, 47.
- ACKMAN, R.G., TOCHER, C.S. y McLACHLAN, J. (1968). J. Fish.  
Res. Bd. Can. 25, 1603.
- ADDISON, R.F. y ACKMAN, R.G. (1970). Lipids, 5, 554.
- ADDISON, R.F., ACKMAN, R.G. y HINGLEY, J. (1968). J. Fish.  
Res. Bd. Can. 25, 2083.
- ADDISON, R.F., ACKMAN, R.G. y HINGLEY, J. (1972). J. Fish.  
Res. Bd. Can. 29, 407.
- ADDISON, R.F., ACKMAN, R.G. y HINGLEY, J. (1973). J. Fish.  
Res. Bd. Can. 30, 113.
- ALVAREZ, P. (1975). Tesis Doctoral. Facultad de Biológicas.  
León. Universidad de Oviedo.
- ARNOLD, S.H. y BROWN, W.D. (1978). Adv. Food Res. 24, 113.
- ATHERTON, W.D. y AITKEN, A. (1970). Comp. Biochem. Physiol.  
36, 719.
- AUSTRENG, E. y REFSTIE, T. (1979). Aquaculture, 18, 145.
- BALDWIN, N.S. (1956). Trans. Am. Fish. Soc. 86, 323.
- BENDALL, J.R. (1974). "Muscles, molecules and movement".  
Heinemann Ed. London American Elsevier Publishing Co.,  
Inc. New York.
- BLACK, E.C., CONNOR, A.R., LAM, K. y CHIN, W. (1962).  
J. Fish. Res. Bd. Can. 19 (3), 409.
- BODWELL, C.E. (1967). Arch. Biochem. Biophys. 122, 246.

- BRADDOCK, R.J. y DUGAN, L.R.Jr. (1972). J. Food Sci. 37, 426.
- BRAEKAN, D.R., LAMBERTSEN, G. y ANDERSSSEN, J. (1971). Fiske-  
ridirektoratets Skriyester Teknologiske Undersokelser. 5, 12.
- BRANDES, C.R. y DIETRICH, R. (1954). Fette und Seifen. 55, 533.
- BRENNER, R.R., VAZZA, D.V. y TOMAS, M.E. (1963). J. Lipid. Res.  
4, 341.
- BRISKEY, E.J., SERAYDARIAN, K. y MOMMAERTS, W.F.H.M. (1967).  
Biochem. Biophys. Acta. 133, 424.
- BROWN, M.E. (1957). "Experimental Studies on Growth." En The Phy-  
siology of Fishes . Editado por Brown, M.E. Vol.1, pag.361-400.  
Academic Press, New York.
- BUHLER, D.R., HALVER, J.E. (1961). J. Nutr. 74, 307.
- BURR, G.O. y BURR, M.M. (1929). J. Biol. Chem. 82, 345.
- CASTELL, J.D., SINNHUBER, R.O., WALES, J.H. y LEE, D.J. (1972a)  
J. Nutr. 102, 77.
- CASTELL, J.D., SINNHUBER, R.O., LEE, D.J. y WALLES, J.H. (1972b).  
J. Nutr. 102, 87.
- CASTELL, J.D., LEE, D.J. y SINNHUBER, R.O. (1972c). J. Nutr.  
102, 93.
- CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y. y WARNER, H. (1956). Anal. Chem.  
28, 1756.
- CHO, C.Y., BAYLEY, H.S. y SLINGER, S.J. (1974). J. Fish. Res.  
Bd. Can. 31 (9), 1523.
- CHRISTIE, W.W., NOBLE, R.C. y MOORE, J.H. (1970). Analyst.  
95, 940.

- CHRISTIE, W.W. (1973). "Lipid Analysis". Ed. Pergamon Press. London.
- COHEN, C. y LANGLEY, W. (1966). Science. 152, 794.
- COMBS, B.D., HEINEMANN, W.W., BURROWS, R.E., THOMAS, A.E. y FOWLER, L.G. (1962). U.S. Fish. Wild Serv. Spec. Sci. Rep. Fish. 432, 7
- CONNELL, J.J. (1953a). Biochem. J. 54, 119.
- CONNELL, J.J. (1962). "Fish muscle proteins". Recent Advances in Food Science. Vol.1. Ed. Butterworths, 136-146, London.
- CONNELL, J.J. (1978). "Control de la calidad del pescado". Ed. Acribia. Zaragoza.
- COSSINS, A.R. (1976). Lipids. 11, 307.
- COWEY, C.N., ADRON, J.W., BLAIR, A. y POPE, J. (1970). Helgoländer wiss. Meeresunters, 20, 602.
- CRANE, F.L. (1959). Plant. physiol. 34, 128.
- DAVIS, H.S. (1934). Trans. Am. Fish. Soc. 64, 197.
- DELONG, D.C., HALVER, J.E. y MERTZ, E.T. (1958). J. Nutr. 65, 589.
- DENG, J.C., ORTHOEFER, F.T., DENNISON, R.A. y WATSON, M. (1976). J. Food Sci. 41, 1479.
- DINGLE, J.R. y DYER, W.J. (1955). J. Fish. Res. Bd. Can. 12 (5), 646.
- DINSMORE, A.H. (1934). Trans. Am. Fish. Soc. 64, 203.
- DITTMER, J.C. y LESTER, R.L. (1964). J. Lipid. Res. 5, 126.

- DYER, W.J. y DINGLE, J.R. (1961). "Fish Proteins with special reference to freezing". Fish as Food. I. Production, Biochemistry and Microbiology, 275-327. Academic Press. New York.
- DYER, W.J., FRENCH, H.V. y SNOW, J.M. (1950). J. Fish. Res. Bd. Can. 7, 585.
- DUDZINSKI, A.E. (1967). J. Chromatogr. 31, 560.
- EATON, C.A., ACKMAN, R.G., TOCHER, C.S. y SPENCER, K.D. (1975). J. Fish. Res. Bd. Can. 32, 507.
- EBASHI, S. y EBASHI, F. (1965). J. Biochem. 58, 7.
- EBASHI, S. y KODAMA, A. (1966). J. Biochem. 60, 733.
- EXLER, J., KINSELLA, J.E. y WATT, B.K. (1975). J. Am. Oil. Chem. Soc. 52, 154.
- FERNANDEZ, M.T. (1977). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Valladolid.
- FERNANDEZ, M.T. (1979). Anal. Fac. Vet. León. 25, 309.
- FERNANDEZ, M.T. y BURGOS, J. (1977). Anal. Fac. Vet. León. 23, 145.
- FOLCH, J., LEES, M. y STANLEY, G.H.S. (1957). J. Biol. Chem. 226, 497.
- FORSTER, R.P. y GOLDSTEIN, L. (1969). "Formation of excretory products". En: Fish Physiology, Vol 1, Eds. W.S. Hoar y D.J. Randall. Academic Press, Inc., New York, pag. 313.
- FOWLER, L.G., McCORMICK, J.H. y THOMAS, A.E. (1964). U. S. Fish. Wild. Serv. Spec. Rep. Fish. 480, 13.

- FREEMAN, N.K., LINDGREN, F.T., YOOK, C.N.G. y NICHOLS, A.V. (1957). J. Biol. Chem. 227, 449.
- FRONTIER - ABOU, D. (1969). Ann. Nutr. 23, 313.
- GONZALEZ; G., ALZUETA, C. y BARRO, C. (1981). "Guía de prácticas de laboratorio". Departamento de Agricultura y Economía Agraria. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid.
- GRAY, G.M. y McFARLANE, M.G. (1961). Biochem. J. 81, 480.
- GUBA, F. y HARSANYI, V. (1966). "Miofibrillin- a new structural protein". Symposium on muscle. Hungarian Acad. of Sci., Budapest.
- GULDBRANDSEN, K.E. y UTNE, F. (1977). Fiskerider. Skr. Ser. Ernaering. 1, 75.
- HALVER, J.E. y TIEWS, K. (1979). Proceeding of <sup>the</sup> World Symposium on Finfish International Conference on Aquaculture and Nutrition. Ed. Halver y Tiews. Berlín.
- HAMID, A., SAKATA, T. y KAKIMOTO, D. (1978). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 44, 53.
- HARDY, R. y KEAY, J.N. (1972). J. Fd. Technol. 7, 125.
- HARDY, R. y McKIE, P. (1969). J. Sci. Food Agric. 20, 193.
- HIGASHI, H., KANEKO, T., ISHII, S., USHIYAMA, M. y SUGIHASHI, T. (1964). Bitamin (Vitamins, Kyoto), 30, 271.
- HIGASHI, H.T., KANEKO, T., ISHII, S., USHIYAMA, M. y SUGIHASHI, T. (1966). J. Vitaminol. 12, 74.

- HIGUERA, M., MURILLO, A., VARELA, G. y ZAMORA, S. (1976).  
Rev. Esp. Fis. **32**, 317.
- HIGUERA, M., ZAMORA, S., MURILLO, A. y VARELA, G. (1977).  
Anal. Bromatol. **29** (2), 221.
- HILDITCH, T.P. y WILLIAMS, P.N. (1964). The Chemical Constitution of Natural fats. 4<sup>th</sup> Ed. Chapman and Hall, London.
- HIRSCH, J. y AHRENS, E.H. (1958). J. Biol. Chem. **233**, 311.
- HOLDEN, H.K.Jr., LIVINGTON, D.L., PHILLIPS, A.M.Jr., PODO-  
 LIAK, H.A., POSTON, H.A., MILLER, J.A., PYLE, E.A., Mc-  
 CARTNEY, T.H. (1966). Fish. Res. Bull. **29**, 82.
- HOOPER, S.N., PARDIS, M. y ACKMAN, R.G. (1973). Lipids. **8**, 509.
- HUXLEY, H.E. (1963). J. Mol. Biol., **7**, 281.
- I.S.O. (1981). Analyse sensorielle. Methodologie - Essai  
 Triangulaire. I.S.O./TC 34/SC 12.
- JACQUOT, R. (1961). "Organic Constituents of Fish and Other  
 Aquatic Animal Foods. En Fish as Food. Vol. 1, pag.146.  
 Brongstrom, G. Ed. Academic Press. New York.
- JANGAARD, P.M., BROCKERHOFF, H., BURGHER, R.D. y HOYLE, R.L.  
 (1967). J. Fish. Res. Bd. Can. **24**, 607
- JEZYK, P.F. y PENICNAK, A.J. (1966). Lipids, **1**, 427.
- KAITARANTA, J.K. y LINKO, R.R. (1979). J. Sci. Food Agric.  
**30**, 921.
- KAUFMAN, H.P. y GOTTSCHALK, E. (1956). Tette. Seifen. Aus-  
 trichm. **58**, 411.



- KAYAMA, M. (1964). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 30, 697.
- KE, P.J. y ACKMAN, R.G. (1976). J. Amer. Oil. Chem. Soc. 53, 636.
- KEMP, P. y SMITH, M.W. (1970). Biochem. J. 117, 9
- KINSELLA, J.E., SHIMP, J.L., MAI, J. y WEIHRANCH, J. (1977).  
J. Am. Oil. Chem. Soc. 54, 424.
- KINSELLA, J.E., SHIMP, J.L., MAI, J. y WEIHRANCH, J. (1977).  
J. Food Biochem. 1, 131.
- KNIPPRATH, W.G. y MEAD, J.F. (1966). Fish. Ind. Res. 3 (1), 23
- KNIPPRATH, W.G. y MEAD, J.F. (1968). Lipids. 3, 121.
- KOMAREK, R.J., JENSEN, R.G. y PICKETT, B.W. (1964). J. Lipid.  
Res. 5, 268.
- KONING, A.J. y McMULLAN, K.B. (1966) J. Sci. Food Agric. 17, 385.
- KONING, A.J. (1966a). J. Sci. Food Agric. 17, 112.
- KONING, A.J. (1966b). J. Sci. Food Agric. 17, 460.
- KUNIMOTO, M., ZAMA, K. y IGARISHI, H. (1975). Bull. Fac. Fish.  
Hokkaido. Univ. 25, 332.
- LEE, D. J., ROEHM, J.N., YU, T.C. y SINNHUBER, R.O. (1967).  
J. Nutr. 92, 93.
- LEE, D.J. y PUTNAM, G.B. (1973). J. Nutr. 103, 916.
- LEHNINGER, A.L. (1974). "Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular". 4ª reimpression. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
- LEWIS, R.W. (1962). Comp. Biochem. Physiol. 6, 75.

- LOPEZ PEREZ, A. (1972). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de León. Universidad de Oviedo.
- LOTINA BENGURIA, R. (1974). Pescado blanco y azul. Gráficas Loroño. Bilbao, pág. 56-59
- LOVERN, J.A. (1942). "The composition of the depot fats of aquatic animals". DSIR Food Investigation Special Report, nº 51
- LOVERN, J. A. (1950). J. Soc. Leather Trades' Chemists, 34, 7
- LOVERN, J. A. (1962). "The lipids of fish and changes occurring in them during processing and storage". En Fish in Nutrition pag.86. Heen, E. y Krenzer, R. Ed. Fishing News Ltd. London.
- LOWRY, R.R. (1968). J. Lipid. Res. 9, 397
- LUQUET, P. (1971). Ann. Hydrobiol. 2(2), 175
- MacLEOD, P., JENSEN, R.G., GANDER, G.W. y SAMPUGNA, J. (1962) J. Bacteriol. 83, 806
- MASSON, L. y BURGOS, M.T. (1973). Grasas y aceites. 24, 327.
- MATSUMOTO, T., SONE, H. y NIIYA, I. (1955). J. Japan. Oil. Chem. Soc. 4, 131
- MEAD, J.F. (1968). Progress in the chemistry of Fats and Other Lipids. Editado por R.T. Holman. Pergamon Press Ltd., Oxford, England.
- MERTZ, E.T. (1969). "Amino acid and protein requirements of fish". En: D.W. Neuhaus y J.E. Halver (Editors), Fish in Research. Academic Press, New York, N.Y. y London. pag.233-244
- MEYER, F.P. (1969). Feedstuffs. 41, 27

- MINISTERIO DE AGRICULTURA (1977). Anuario de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura. Secretaría General Técnica.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA (1978). Anuario de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura. Secretaría General Técnica.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA y ALIMENTACION (1980). Anuario de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA (1981). Manual de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura. Secretaría General Técnica.
- MOORE, D.R. y BAUMAN, C.A. (1952). J. Biol. Chem. **195**, 615.
- MORENO, J.E.A., MORENO, V.J. y BRENNER, R.R. (1976). Lipids. **11**, 561.
- MORI, M. y HIKICHI, S. (1976). Nippon Suisan Kabushiki Kaisha Chuo Kenkyusho Hokoku, **11**, 12.
- MORRISON, W.R., JACK, E.L. y SMITH, L.M. (1965). J. Am. Oil. Chem. Soc. **42**, 1142.
- MORRISON, W.R. y HAY, J.D. (1970). Biochim. Biophys. Acta. **202**, 460.
- NICOLAIDES, N. y WOODALL, A.N. (1962). J. Nutr. **78**, 431.
- NRC (1973). "Nutrient requirements of trout, salmon and catfish". National Academy of Sciences, National Research Council, Washington, D.C.
- ORDOÑEZ PEREDA, J.A. (1974). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de León. Universidad de Oviedo.

- OWEN, J.M., ADRON, J.W., MIDDLETON, D. y CAWLEY, C.R. (1975).  
Lipids. 10, 528.
- PARADIS, M. y ACKMAN, R.G. (1976). Lipids. 11, 871.
- PARADIS, M. y ACKMAN, R.G. (1976a). Lipids. 11, 863.
- PASCAL, J.C. y ACKMAN, R.G. (1976). Chem. Phys. Lip. 16, 219.
- PAUL, A.A. y SOUTHGATE, D.A.T. (1979). McCance and Widdowson's  
The composition of Foods. Ed. H.M.S.O. y Elsevier/North  
 Holland. Biomedical Press.
- PHILLIPS, A.M.Jr., TUNISON, A.V., y BROCKWAY, D.R. (1948). Fish.  
Res. Bull. n° 11 .
- PHILLIPS, A.M.Jr., LOVELACE, D.R., BROCKWAY, D.R. y BALZER, G.C.Jr.  
 (1952). The nutrition of trout. Cortland Hatchery Report  
 n° 21, Fisheries Research Bulletin n°16. New York Conser-  
 vation Department, Albany, N.Y., p.46.
- PHILLIPS, A.M.Jr., LOVELACE, F.F., PODOLIAK, H.A., BROCKWAY, D.R.,  
 y BALZER, G.C.Jr. (1956). Fish. Res. Bull. n° 18.
- PHILLIPS, A.M.Jr., LIVINGSTON, D.L., POSTON, M.A. y BROOKE, M.A.  
 (1963). Prog. Fish. Cult., 25, 8
- PHILLIPS, A.M.Jr., LIVINGSTON, D.L. y POSTON, H.A. (1965).  
Fish. Res. Bull. n° 29
- PHILLIPS, A.M.Jr. (1969). "Nutrition, digestion and energy  
 utilization". En : Fish Physiology, vol.1. Eds. W.S. Hoar  
 y D.J. Randall. Academic Press, Inc., New York, pag.391.

- POLESELLO, A., MANNINO, S. y PIZZOCARO, F. (1977). Riv. Ital. Sost. Grasse. 54, 27
- RAHEJA, R.K., KAUR, C., SINGH, A. y BHATIA, I.S. (1973). J. Lipid. Res. 14, 695
- READ, L.J. (1968). Biol. Bull. 135, 537
- REISER, R., STEVENSOS, B., KAYAMA, M., CHOUDHURY, R.B.R. y HOOD, D.W. (1963). J. Am. Oil. Chem. Soc. 40, 507
- RINGROSE, R.C. (1971). J. Fish. Res. Bd. Can. 28, 1113
- ROOTS, B.I. (1968). Comp. Biochem. Physiol. 25, 457
- SANZ PEREZ, B., y JONES, N.R. (1962). J. Food Sci. 27(1), 69
- SATIA, B.P. (1974). Prog. Fish. Cult. 36, 80
- SCHLENK, H. y GALLERMAN, J.L. (1960). Anal. Chem. 25, 1650
- SCHLENK, H. (1970). "Odd numbered polyunsaturated fatty acids"  
En: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids.  
Ed. R.T. Holman. Pergamon, Oxford. Vol.9, Part 5, 587-605
- SCOPES, R.K. (1964). Biochem. J. 91, 201
- SEAGRAN, H.L. (1958). Food Res. 23(2), 143
- SHAW, N. (1968). Biochim. Biophys. Acta. 164, 435.
- SHEATA, A.J., DEMAN, J.M. y ALEXANDER, J.C. (1970). Can. Inst. Food Technol. J. 3(3), 85
- SHEWAN, J.M., FLETCHER, L.I., PARTRIDGE, S.M. y BRIMLEY, R.C. (1952). J. Sci. Food. Agric. 3, 394
- SHIMMA, Y. y TAGUCHI, H. (1964). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 30, 918

- SIDWELL, V.D., FONCANNON, P.R., MOORE, N. y BONNETT, J. (1974). Marine Fisheries Rev. **36**, 21.
- SINNHUBER, R.O. (1969). "The role of fats". En: Fish in Research, eds. O.W. Neuhaus y J.E. Halver. Academic Press, New York.
- SMITH, R.R. (1971). Prog. Fish Cult. **33**, 132.
- SOUDAN, F. (1965). "La conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques". Bailliere, J.B. et fils., 32-57. París.
- STANSBY, M.E. (1969) World. Rev. Nutr. Dietetics. **11**, 46.
- STANSBY, M.E. (1973). J. Am. Dietetic Assoc. **63**, 625.
- STANSBY, M.E. y OLCOTT, H.S. (1967). "Composición del pescado". En : Tecnología de la industria pesquera. pag.393. Ed. Acribia. Zaragoza.
- STEFFENS, W. (1974). Nahrung. **18**, 789.
- STICKNEY, R.R. y ANDREWS, J.W. (1971). J. Nutr. **101**, 1703.
- STICKNEY, R.R. y ANDREWS, J.W. (1972). J. Nutr. **102**, 249.
- SUMMER, J.L. y HOPKIRK, J. (1976). J. Sci. Food Agric. **27**, 933
- SUYAMA, M., SUZUKI, T., MARUYAMA, M. y SATO, K. (1970). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **36**, 1048.
- SUYAMA, M. y YOSHIKAWA, Y. (1973). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **39**, 1339.
- SUYAMA, M. y SUZUKI, H. (1975). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **41**, 787.

SWERN, D. (1964). "Bailey's Industrial Oil and Fat Products".

3ª Edición, Interscience Publishers, New York.

SWIFT, D.R. (1961). J. Exp. Biol. 38, 595.

THURSTON, C.E., STANSBY, M.E., KARRICK, N.L., MIYAUCHI, D.T.

y CLEGG, W.C. (1959). Food Res. 24, 493

TINOCO, J., BABCOCK, R., HINCENBERGS, I., MEDWADOWSKI, B.,

MILJANICH, P. y WILLIAMS, M.A. (1979). Lipids. 14, 166

TOYOMIZU, M., KAWASAKI, K. y TOMIYASU, Y. (1963). Bull. Jap.

Soc. Sci. Fish. 29, 957.

TREVELYAN, W.e., PROCTER, D.P. y HARRISON, J.S. (1950).

Nature. 166, 444

UEDA, T. (1976). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 42, 479.

VIVIANI, R., CORTESI, P., CRISSETIG, G., MANCINI, L., POLETTI,

R. y BORGATTI, A.R. (1968) Riv. Ital. Sost. grasse. 45, 779.

VIVIANI, R., BORGATTI, A.R., MANCINI, L. y CORTESI, P. (1967)

Atti. Soc. Ital. Sci. Vet. 21, 706.

VORBECK, M.L. y MARINETTI, G.V. (1965). J. Lipid. Res. 6, 3.

WAGNER, H., HORHAMMER, L. y WOLF, P. (1961). Biochem. Z.

334, 175.

WATANABE, T. y ACKMAN, R.G. (1974). J. Fish. Res. Bd. Can. 31, 403

WATTS, R.L. y WATTS, D.C. (1974) Nitrogen metabolism in fishes.

Chemical Zoology. Academic Press. London and New York.

Vcl. 8, pag. 369-446.

- WOJNO, T. y TUCHOLSKI, S. (1978). Raczniki Nauk Rolniczych.  
99, 193.
- YU, T.C. y SINNHUBER, R.O. (1975). Lipids. 10(2), 63
- YU, T.C., SINNHUBER, R.O. y PUTNAM, C.B. (1977). Lipids.  
12(6), 495
- ZAITSEV, V., KIZEVETTER, I., LAGUNEV, L., MARAKOVA, T., MINDER,  
 L. y PODSEVALOV, V. (1969). "Fish curing and processing".  
 Mir publishers. Moscow.
- ZUGAZA, A. (1982). Comunicación personal.
- ZUMALACARREGUI, J. y BURGOS, J. (1975). Anal. Fac. Vet. León  
21, 431.

